



Université de Sherbrooke

**Étude du facteur cellulaire PICH-115 comme un cofacteur de la protéine trans-  
activatrice Tat dans la transcription du VIH**

Par

Taharima Habib

Programme de Microbiologie et Infectiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise ès sciences (M.Sc)  
en Microbiologie

Sherbrooke, Québec, Canada

Juillet 2016

Membres du jury d'évaluation

Pr. Brendan Bell, Département de Microbiologie

Pr. Benoît Chabot, Département de Microbiologie

Pr. François Bachand, Département de Biochimie

© Taharima Habib, 2016

## RÉSUMÉ

### **Étude du facteur cellulaire PICH-115 comme un cofacteur de la protéine trans-activatrice Tat dans la transcription du VIH**

Par

Taharima Habib

Programme de Microbiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc) en microbiologie, Faculté de médecine et sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4

Au début des années 1980, les premiers cas du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) causés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ont été décrits par le CDC (Center of Disease Control) Américain. Cette maladie cause la détérioration du système immunitaire en diminuant le compte de lymphocytes T CD4+ d'une manière drastique. Le SIDA a causé 34,2 millions de décès depuis les années 80. Cependant, avec 36,9 millions de personnes infectées mondialement à la fin de 2014, la maladie est aujourd'hui considérée comme un syndrome chronique (WHO, 2015). Malgré qu'il n'y ait pas de remède permanent pour le VIH/SIDA, les personnes infectées peuvent mener une vie d'une qualité et durée presque normale grâce au développement du traitement anti-rétroviral combinatoire (cART) ou traitement anti-rétroviral de haute efficacité (HAART) (Perelson et al., 1997). Quand bien même que ce traitement puisse amener la virémie d'un patient en-dessous d'un seuil de détection, soit de 50 copies/ml de sérum, il est incapable de complètement supprimer le virus du corps du patient. Cet obstacle est dû à l'habileté du VIH d'établir des réservoirs latents de cellules immunitaires (Van Lint et al., 2013). Lors de l'activation des cellules immunitaires infectées par les virus latents, la transcription du virus est également activée et la production de virions s'en suit. Le contrôle de la latence du VIH se ferait alors au niveau de la transcription du provirus.

Le contenu de ce mémoire rapporte le rôle d'un nouveau facteur cellulaire, PICH-115, dans la transcription du VIH via son interaction avec la protéine trans-activatrice virale Tat. Leur interaction directe observée par des essais *in vitro* de GST-pulldown pourrait expliquer l'importance de PICH-115 dans la transcription virale. En outre, cette association protéique améliore l'interaction entre Tat et son partenaire de trans-activation l'ARN TAR du VIH, visualisé par retardement sur gel natif. Ensemble, ces observations mènent à croire que la protéine cellulaire PICH-115 joue un rôle important dans la transcription du VIH. Il serait dorénavant intéressant de déterminer quels sont les conséquences des interactions protéiques sur la transcription virale *in cellulo* dans des cibles biologiques du VIH telles que les lymphocytes T CD4+ et les macrophages.

Mots clés : HIV, SIDA, virus, cART, transcription, PICH115, Tat, trans-activation

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé .....	ii
Table des matières .....	iii
Liste des figures .....	vii
Liste des tableaux .....	viii
Liste des abréviations .....	ix
Introduction .....	1
1.1) VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE .....	1
1.1.1) Caractéristiques générales .....	1
1.1.2) Transmission .....	2
1.1.3) Organisation génomique .....	3
1.1.4) Affaiblissement du système immunitaire .....	5
1.1.4.1) Les cellules ciblées .....	5
1.1.4.2) Les maladies associées au SIDA .....	5
1.1.5) Protéines virales et leurs rôles .....	6
1.1.5.1) Les protéines du gène gag .....	6
1.1.5.2) Les protéines du gène pol .....	6
1.1.5.2.1) La rétro-transcriptase .....	6
1.1.5.2.2) L'intégrase .....	6
1.1.5.2.3) La protéase .....	7
1.1.5.3) Les protéines du gène env .....	7
1.1.5.4) Les protéines accessoires .....	8
1.1.5.4.1) Nef/Vpu .....	8
1.1.5.4.2) Vpr .....	8
1.1.5.4.3) Vpx/Vif .....	8
1.1.5.5) Les protéines régulatrices .....	8
1.1.5.5.1) Rev .....	8
1.1.5.5.2) Tat .....	9

1.1.6) Le traitement ART et le cycle réplcatif du VIH .....	11
1.1.6.1) L'entrée du VIH dans sa cellule cible.....	12
1.1.6.2) La transcription inverse .....	13
1.1.6.3) L'intégration de l'ADNc dans le génome de la cellule hôte .....	14
1.1.6.4) La sortie et maturation des virions VIH.....	15
1.2) L'ÉVASION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE HÔTE PAR LE VIH .....	17
1.2.1) L'hypermutation ou l'hypervariation du génome viral .....	17
1.2.1.1) Les causes virales .....	17
1.2.1.2) Les causes cellulaires .....	17
1.2.1.2.1) Les protéines APOBECS .....	17
1.2.1.2.2) SAMHD1 .....	18
1.2.1.3) Effets de l'hypermutation génomique .....	19
1.2.2) La latence .....	20
1.2.2.1) Qu'est-ce qu'un réservoir latent?.....	20
1.2.2.2) La latence, l'obstacle à l'éradication du VIH par ART .....	21
1.2.2.3) Les stratégies de guérison .....	21
1.2.2.3.1) La méthode stérilisante : <i>Shock and Kill</i> .....	23
1.2.2.3.2) La méthode fonctionnelle .....	26
1.2.2.4) La clé à la latence est dans la transcription virale .....	27
1.3) LA TRANSCRIPTION .....	28
1.3.1) La transcription générale cellulaire.....	28
1.3.1.1) L'initiation .....	29
1.3.1.2) L'élongation .....	30
1.3.2) La transcription du provirus VIH .....	31
1.3.2.1) L'initiation .....	32
1.3.2.2) L'élongation .....	33
1.3.3) Le promoteur du VIH et l'axe de trans-activation Tar/TAR .....	35
1.3.3.1) Identification des protéines de PICH.....	35
1.3.3.1.1) PICH-115 .....	36
1.4) HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE .....	39
Objectifs .....	39

Les objectifs .....	40
2.1) OBJECTIF I.....	40
2.1.1) MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	40
2.1.1.1) Souches de bactéries utilisées .....	40
2.1.1.2) Clonage des plasmides.....	41
2.1.1.3) Production des protéines recombinantes .....	43
2.1.1.3.1) Flag-PICH115-8His .....	43
2.1.1.3.2) GST-Tat et mutants .....	44
2.1.1.4) Tests d'induction .....	44
2.1.1.5) Purification des protéines recombinantes .....	45
2.1.1.5.1) Flag-PICH115-8His .....	45
2.1.1.5.2) Dialyse en étapes .....	46
2.1.1.5.3) GST-Tat et mutants .....	48
2.1.1.5.4) Dialyse .....	49
2.1.1.6) Interaction entre protéines recombinantes par GST-Pulldown .....	49
2.1.1.7) Quantification et normalisation des interactions protéine-protéine.....	51
2.1.2) RÉSULTATS.....	52
2.1.2.1) Purification des protéines recombinantes .....	52
2.1.2.2) Tat nécessite les domaines central et basique pour interagir avec PICH-115 .	55
2.1.2.3) Les mutations ponctuelles choisies dans Tat n'influencent pas son interaction avec PICH-115 .....	56
2.2) OBJECTIF II.....	58
2.2.1) MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	58
2.2.1.1) EMSA-TAR .....	58
2.2.1.2) EMSA-TAR avec Super Shift (SS) .....	59
2.2.1.3) Quantification des complexes de GST-Tat et TAR.....	60
2.2.2) RÉSULTATS.....	61
2.2.2.1) Tat lie TAR d'une manière spécifique en présence et en absence de PICH-115 .....	61
2.2.2.2) L'enrichissement du complexe Tat/TAR est spécifique à la présence de PICH-115 .....	64
2.2.2.3) PICH-115 n'est pas présent dans le complexe Tat/TAR in vitro .....	65

2.2.2.4) PICH-115 facilite l'interaction entre Tat et TAR .....	67
2.2.2.5) Les activités enzymatiques de PICH-115 ne sont pas requises pour l'enrichissement de l'interaction Tar/TAR.....	70
Discussion .....	73
3.1) PICH-115, UN NOUVEAU COFACTEUR CELLULAIRE DE LA PROTÉINE VIRALE TAT .....	74
3.1.1) Cartographie de l'interaction entre PICH-115 et Tat .....	75
3.1.2) Les domaines central et basique de Tat sont nécessaires pour interagir avec PICH-115 .....	75
3.2) PICH-115 AUGMENTE L'INTERACTION ENTRE GST-TAT ET TAR.....	80
3.2.1) PICH-115 cause une modification de Tat pour assurer une meilleure liaison à TAR.....	80
3.2.2) PICH-115 agit comme une protéine chaperonne de Tat .....	82
3.3) CONCLUSION .....	83
3.4) PERSPECTIVES .....	84
Remerciements.....	87
Liste des références.....	88

## Liste des figures

Figure 1. Taux de séroprévalence mondiale chez les adultes âgés de 15-49ans.....	3
Figure 2. Schéma des génomes des provirus VIH-1 et VIH-2 .....	4
Figure 3. Schéma de la protéine régulatrice Tat du VIH-1 .....	11
Figure 4. Schématisation du cycle réplcatif du VIH .....	16
Figure 5. Changement dynamique de la virémie chez les individus séropositifs sous un traitement ART combinatoire (cART) .....	23
Figure 6. Stratégie de déplétion de la virémie par la stérilisation des réservoirs latents	24
Figure 7. Initiation de la transcription cellulaire pol II – dépendante .....	30
Figure 8. Promoteur du VIH .....	32
Figure 9. Séquence d'ADN du promoteur central du VIH : TASHET .....	33
Figure 10. Structure cristalline du complexe P-TEFb et Tat .....	34
Figure 11. Alignement des séquences consensus de TmcA et de ses homologues dans différents organismes .....	36
Figure 12. Effet de la déplétion de PICH-115 endogène sur l'activité du promoteur du VIH .....	38
Figure 13. PICH-115 purifié.....	53
Figure 14. GST-Tat purifié .....	54
Figure 15. GST-Pulldown des protéines Tat tronquées .....	56
Figure 16. GST-Pulldown des mutants Tat avec PICH-115 TS.....	57
Figure 17. Essai de spécificité d'interaction entre GST-Tat et ARN TAR par EMSA-TAR.....	63
Figure 18. Essai de spécificité de l'enrichissement de l'interaction entre GST-Tat et TAR.....	65
Figure 19. Test des anticorps de <i>Super Shift</i> (SS) contre PICH-115 et GST-Tat dans un EMSA TAR .....	67
Figure 20. Comparaison des complexes formés avec l'ARN TAR et différents mutants de GST-Tat .....	68
Figure 21. Essai EMSA-TAR avec les cofacteurs de PICH-115 .....	72
Figure 22. Structure 3D de la protéine Tat .....	78
Figure 23. Modèle d'interaction protéique au niveau du PICH et l'axe de trans-activation du VIH.....	84



**Liste des tableaux**

Tableau 1. Les homologues de PICH-115 dans divers organismes .....	37
Tableau 2. Liste des amorces utilisées pour les clonages de Flag-PICH115-8His .....	42
Tableau 3. Liste des amorces utilisées pour les clonages de GST-Tat .....	43
Tableau 4. Tampons de lavage utilisés pour la purification de Flag-PICH115-8His ...	46
Tableau 5. Tampons de Dialyse en STEP de Flag-PICH115-8His .....	47

## Liste des abréviations

°C : degré celcius

3' : extrémité 3' d'un nucléotide, le groupement OH est libre sur le carbone 3' du sucre

5' : extrémité 5' d'un nucléotide, le groupement OH ou ester phosphate sur le carbone 5' du sucre

$\alpha$  : alpha

$\beta$  : beta

$\gamma$  : gamma

$\Delta$  : delta – signifie une délétion

$\kappa$  : kappa

$\mu$ l : microlitre

g : force G

A : ampère ou adénosine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AGO1 : Argonaute 1 – enzyme qui clive l'ARN

AIDS/SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise

APOBEC3G : «Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3G» – enzyme de restriction

ARN : Acide ribonucléique

ARNase : Nucléase – enzyme qui clive l'ARN

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNr : Acide ribonucléique ribosomal

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

ART : «Anti-retroviral therapy » – Traitement antirétroviral

ATP : Adénosine triphosphate

ATPase : Adénosine triphosphatase – enzyme qui hydrolyse un groupement phosphate d'une molécule d'ATP pour libérer de l'énergie utilisée par la cellule

ARV : Antirétroviral

Bcl2 : «B cell lymphoma 2 » – lymphome de cellules B

BI : Boehringer Ingelheim

BMS : Bristol-Myers Squibb

BRD4 : «Bromodomain protein 4 » - protéine avec un bromodomaine

BSA : «Bovine serum albumin » - Sérum d'albumine bovine

C : Cytosine et/ou complexes

cART : «Combination anti-retroviral therapy » - traitement antirétroviral combinatoire

CCR5 : «CC Chemokine receptor 5 » – corécepteur membranaire des monocytes liant les glycoprotéines à la surface du VIH

CXCR4 : «Chemokine receptor X4 » – corécepteur membranaire des cellules

T/macrophages liant les glycoprotéines à la surface du VIH

CD4 : «Cluster of differentiation 4 » – récepteur membranaire des cellules T

CDK9 : «Cyclin-dependant kinase 9 » – enzyme qui ajoute un groupement phosphate à son substrat à partir d'une molécule d'ATP

**CPI<sub>n</sub>**: Complexe de pré-intégration

**CRISPR**: «Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats » - séquence d'ADN bactérienne qui sert à entreposer des fragments d'ADN acquis par la dégradation d'ADN venant des phages et/ou bactéries pathogènes

**CTD**: «C-terminal domain » – domaine carboxy-terminal de la polII

**DO**: Densité optique

**dNTPs**: Désoxynucléoside triphosphates

**dNTPase**: Désoxynucléoside triphosphatase – hydrolyse un groupement phosphate d'un nucléotide

**DSIF**: «DRB Sensitivity Inducing Factor » - protéine qui rend les facteurs de transcription sensible au DRB

**DTT**: Dithiothreitol

**EC**: «Elite controller » – patients séropositifs infectés du VIH, mais qui ne développent pas le SIDA et peuvent contrôler efficacement la réplication virale sans avoir recourt aux drogues antirétrovirales

**EDTA**: tétraacétate d'éthylènediamine disodium

**env** : gène codant les protéines de l'enveloppe viral

**EMSA**: «Electrophoretic mobility shift assay » – retard sur gel

**G**: Guanosine

**gag** : «group-specific antigen » – gène du VIH codant pour des protéines structurales

**GE** : General Electric

**gp160**: glycoprotéine 160

**gp120**: glycoprotéine 120

**gp41**: glycoprotéine 41

**GST** : Glutathione S transférase – enzyme bactérienne utilisée comme étiquette protéique pour purification de protéine

**GTF** : « General transcription factors » - Facteurs de transcription générale

**HAART** : «Highly active anti-retroviral therapy » – traitement antiretroviral de haute performance

**HAT**: Histone acétyl-transférase – enzyme qui ajoute un groupement acétyle à un résidu de lysine sur une histone à partir d'une molécule d'acétyl-CoA dans le but de décompacter la chromatine

**HDAC**: Histone désacétylase – enzyme qui enlève le groupement acétyle des histones dans le but d'empacter la chromatine et réprimer la transcription des gènes

**HEK293**: «Humain embryonic kidney 293 cells » – lignée cellulaire cancéreuse

**HEXIM1**: «Hexamethylene bis-acetamide inducible 1 » – protéine inhibitrice de Cycline T1

**HMT**: Histone méthyltransférase – enzyme qui ajoute un à trois groupements méthyle aux résidus lysine et arginine des histones 3 et 4 pour réguler l'expression des gènes

**hTR**: «human telomerase RNA » – l'ARN de la télomérase humaine

**INF**: Interféron – protéines de signalisations produites par les cellules en réponses à la présence de pathogènes inconnus

**IPTG**: Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

**KCl**: Chlorure de potassium

**kDa**: kiloDalton

**KOH**: Hydroxide de potassium

**lacO**: Opéron lactose – regroupement de gènes qui opèrent sous le signal d'un seul promoteur, retrouvé chez les bactéries

**LB**: «Luria broth » – milieu de croissance bactérienne

**LANL**: Los Alamos National Labs

**LEDGF/p75**: «Lens epithelial derived growth factor /p75 »

**LTR**: «long terminal repeat » – longues séquences répétées retrouvées aux extrémités du génome du VIH

**LRA**: «Latency reversing agents – agents pharmaceutiques qui soulèvent la latence

**MEX3C**: «Mex-3 RNA Binding Family Member C » – enzyme qui lie la protéine ubiquitine à une autre protéine pour démarrer la dégradation protéosomale de celle-ci

**MgCl<sub>2</sub>**: Dichlorure de magnésium

**min**: minute

**ml**: millilitre

**mM**: millimolaire

**n** : nombre de fois qu'une expérience a été répétée

**NAT10**: «N-acetyltransferase 10 » - Nom commun de PICH-115

**NELF**: «Negative elongation factor » – complexe de protéine qui inhibe l'élongation de la transcription d'un gène

**NES**: «Nuclear export signal » – signal d'exportation nucléaire

**NFAT**: «Nuclear factor of activated T cells » – activateur de transcription des lymphocytes T activés

**NFκB**: «Nuclear factor κ B » – activateur de transcription

**Ni-NTA** : «Nickel- NitriloTriacetic acid » - Nickel - Acide NitriloTriacétique

**NLS**: «Nuclear location signal » – signal de localisation nucléaire

**nm**: nanomètre

**NNRTI**: «Non-nucleosidic reverse-transcriptase inhibitor » - Inhibiteur non-nucléosidique de la RT

**NP40**: Nonidet P-40

**NRTI**: «Nucleosidic reverse-transcriptase inhibitor » - Inhibiteur nucléosidique de la RT

**N-terminal** : amino-terminal

**NTA**: « Nitrilotriacetic acid »

**ORF** : «Open reading frame » – cadre de lecture d'un gène

**PCR**: «Polymerase chain reaction » - Réaction de polymérisation en chaîne

**pH** : unité de mesure de l'acidité d'une solution

**PIC**: «Pre-initiation complex » – complexe de pré-initiation de la transcription

**PICH**: «Pre-initiation complex of HIV » – complexe de pré-initiation de la transcription du VIH

**PKC**: Protéine kinase C

**PMSF**: Phenylmethylsulfonyl fluoride

**pol**: polymérase – enzyme qui synthétise l'ADN ou l'ARN à partir des nucléotides

**polII** : ARN polymérase II

**P-TEFb**: «Positive transcription elongation factor b » – complexe protéique qui active l'élongation de la transcription

**qPCR**: «quantitative polymerase chain reaction » - Réaction de polymérisation en chaîne quantitative

**RISC**: «RNA-induced silencing complex » – complexe ribonucléoprotéique de silençage induit par un fragment d'ARN

**RPM**: rotation par minute

**RRE**: «Rev-responsive element » – séquence d'ARN de structure complexe formé par un ARNm non-épissé ou partiellement épissé de la protéine Rev. L'interaction entre RRE et Rev est important pour la régulation de l'expression de la protéine.

**RSK2**: «90p ribosomal protein S6 kinase 2» - protéine kinase qui active la transcription par l'ARN polymérase II

**RT**: Rétro-transcriptase – enzyme qui synthétise de l'ADN complémentaire à partir d'une séquence d'ARN

**SAHA**: «Suberanilohydroxamic acid» – inhibiteur des HDAC

**SAMHD1**: « SAM domain and HD domain containing protein 1» - protéine cellulaire inhibitrice de la RT virale

**SDS-PAGE**: «Sodium dodecyl sulfate» – polyacrylamide gel electrophoresis

**snRNA**: «Small nuclear ribonucleic acid» – petits RNA nucléaires

**TAF** : «TBP-associated factor» - Facteurs de transcriptions associés à TBP

**TAM** : «Thymidine analog mutations» – mutations retrouvées dans la RT virale qui cause une résistance aux drogues antirétrovirales qui sont en forme d'analogues de thymidine

**TAR** : «Tat-activation response element» – ARN naissant lors de la transcription du VIH en forme de tige-boucle-bourgeon qui interagit avec la protéine virale Tat

**TASHET** : «Tata box and Adjacent Sequences of HIV Essential for Tat trans-activation» – séquence d'ADN dans le promoteur central du VIH contenant les motifs CTGC autour de la boîte TATA qui sont essentiels à la trans-activation de la transcription du VIH par la protéine Tat

**TBP** : «TATA-binding protein» - protéine liant la boîte TATA

**T<sub>CM</sub>**: «Central memory T cells» - Cellule T mémoire central

**TFIIA/B/D/E/F/H**: «Transcription factor II»

**TmcA**: «tRNAMet cytidine acetyl- transferase»

**TNF** : «Tumor necrosis factor» – facteur de nécrose tumorale, une cytokine impliquée dans la voie d'inflammation en présence de pathogène

**Tp** : Température pièce

**TS** : Type sauvage

**TSS** : «Transcription start site» – site de départ de la transcription, lié par les

**T<sub>TM</sub>**: «Transitional memory T cells» - Cellules T mémoire de transition

**U** : Unité

**V** : Volts

**VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humaine

**VIS** : Virus de l'Immunodéficience Simienne

**Vpr** : «Viral protein r» - protéine virale r

**Vpu** : «Viral protein u» - protéine virale u

**Vpx** : «Viral protein x» - protéine viral x

## Introduction

### 1.1 LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE

#### 1.1.1 Caractéristiques générales

Le VIH est un virus de la famille des *Retroviridae*, appartenant au genre *Lentivirus*. C'est un virus dont le génome est composé d'ARN à l'intérieur d'une capsidie protéique qui est entourée d'une enveloppe de glycoprotéines. Le VIH nécessite un hôte pour se répliquer. Puisqu'il appartient au genre de *Lentivirus*, son cycle reproductif est considéré lent, c'est-à-dire que le virus gardera sa cellule hôte en vie le plus long possible pour produire le plus de particules virales. Le VIH a été identifié comme un rétrovirus à cycle à la fois lytique et lysogénique pour la première fois par le docteur Robert Gallo, dans les années 80. Ce virus peut mener au Syndrome de l'Immunodéficience Acquise (SIDA) lorsque non contrôlé, ce qui affaiblit le système immunitaire du corps humain. En ciblant les composantes majeures du système immunitaire acquis (les lymphocytes T ainsi que les macrophages) cette maladie réduit la capacité du corps humain à se défendre contre des infections opportunistes et autres maladies associées (Poiesz et al., 1980; Barré-Sinoussi et al., 1983).

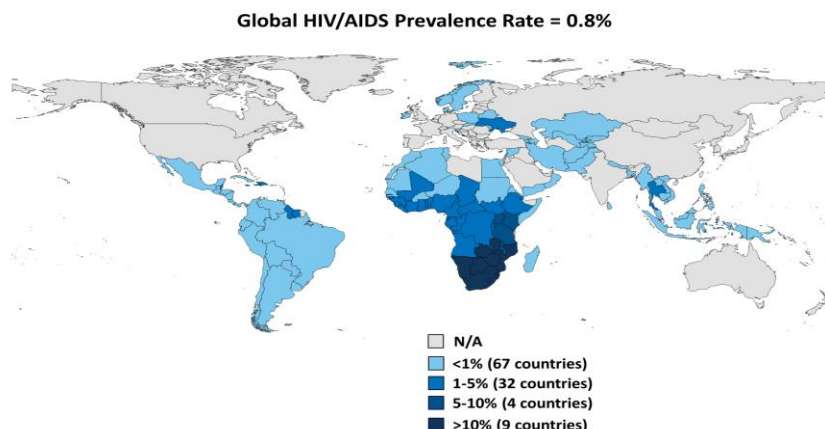
Le virus de l'immunodéficience humaine dérive d'un ancêtre qui infecte les singes en Afrique, le virus de l'immunodéficience simienne (VIS). Son apparition dans la population humaine aurait eu lieu par l'infection d'une personne par ce virus simien qui s'est par la suite adapté au corps humain. Il existe deux souches de ce virus, VIH-1 et VIH-2, qui sont similaires dans leur mode d'infection et au niveau de l'organisation de leur génome (figure 2). Alors que le VIH-1 est répandu à une échelle mondiale, le VIH-2 se présentait majoritairement dans l'Afrique de l'ouest. Toutefois, aujourd'hui cette souche est retrouvée en Europe, Inde et même aux États-Unis. (Gallo, 2006; Campbell-Yesufu et Gandhi, 2011; Nyamweya et al., 2013).

### 1.1.2 Transmission

Le premier, et le plus fréquent, mode de transmission du VIH est par l'échange des fluides corporels lors d'un rapport sexuel. Les particules virales d'une personne infectée se retrouvent facilement dans les tractus génitaux, ainsi dans le sperme et les sécrétions vaginales. Les fluides pré-éjaculatoires et rectaux contiennent également des virions (Aids.gov). En fait, les populations les plus atteintes du VIH sont celles qui pratiquent les rapports sexuels non-protégés polygames, par exemple, la majorité des populations de l'Afrique sub-saharienne (figure 1). La prévalence du SIDA est également élevée chez les hommes homosexuels qui pratiquent les relations sexuelles anales (Beyrer et al., 2012; Beyrer et al., 2013).

Le deuxième mode de transmission du VIH est par le contact sanguin. Bien que les virions présents dans le plasma aient une durée de vie de 0.3 jours, la transmission de l'infection par le sang est importante. Ceci comprend le partage des seringues souillées par des utilisateurs de drogues intraveineuses et dans les cas moins fréquents, une transfusion sanguine contaminée. Une troisième façon de contracter le virus de l'immunodéficience humaine est de mère à enfant. Il est possible qu'une femme enceinte infectée puisse transmettre le VIH au fœtus de façon intra-utérine ainsi que lors de l'accouchement. Pour cette raison, le CDC encourage les femmes enceintes, ou qui planifient une grossesse de se faire tester le plus tôt possible (CDC MMWR 2006). Le lait maternel d'une mère porteuse peut également transmettre le virus à son nouveau-né (Perelson et al., 1996; Aids.gov ; ICAD2001).

## Adult HIV Prevalence Rate, 2014



NOTES: Data are estimates. Prevalence rates include adults ages 15-49.  
SOURCE: Kaiser Family Foundation, based on UNAIDS, How AIDS Changed Everything; 2015.



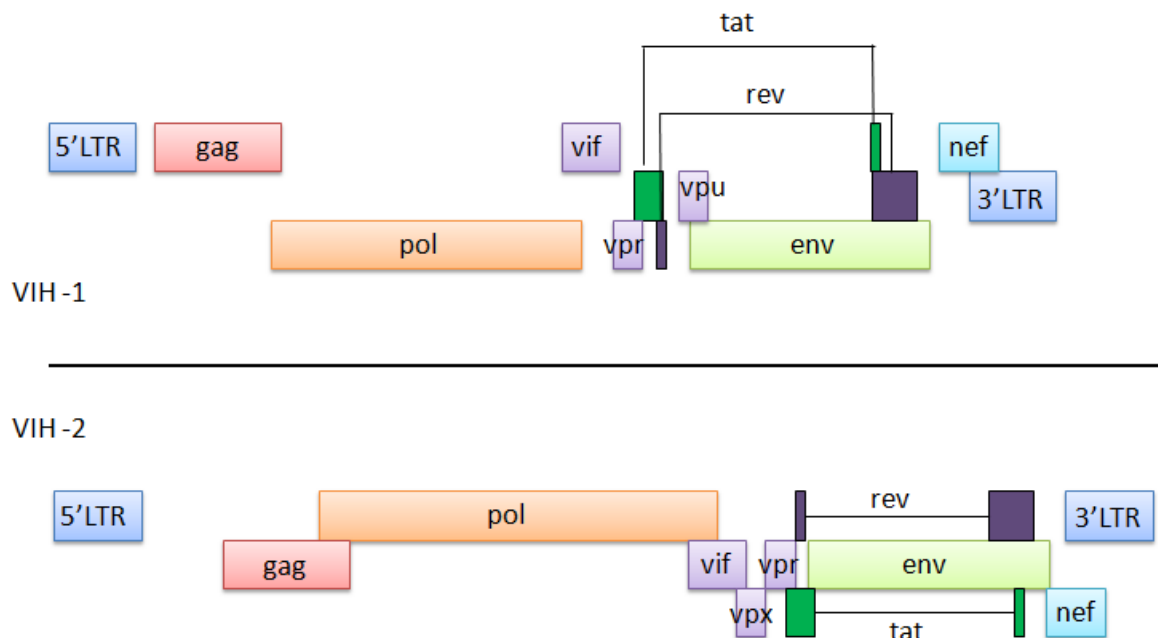
**Figure 1. Taux de séroprévalence mondiale chez les adultes âgés de 15-49ans.** Les pays sont représentés par un gradient de bleu pâle (pays avec <1% d'adultes séropositifs) à un bleu foncé (>10% d'adultes séropositifs). De plus, les populations représentées avec le bleu le plus foncé se retrouvent dans la région sub-saharienne de l'Afrique, où se retrouvent également la population la moins développée au monde. (Tiré du Kaiser Family Foundation)

### 1.1.3 Organisation génomique

Le génome du VIH comprend des *long terminal repeats* (LTR) aux deux extrémités, 5' et 3'. Entre ces LTRs se trouvent les séquences codantes pour les divers gènes viraux représentés dans la figure 2, ci-dessous. Le cadre de lecture (ORF) principal contient les gènes *gag* (encodant les précurseurs des protéines de la matrice virale, p17, la capside virale, p24, la nucléocapside, p7, et les protéines gag p1, p2 et p6), *pol* (encodant les précurseurs de la protéase, rétro-transcriptase et intégrase virales) et *env* (encodant le précurseur des glycoprotéines de l'enveloppe). Il y a également des cadres de lecture plus petits, chevauchant le cadre principal, qui codent pour les protéines régulatrices, Tat et Rev, et accessoires virales dont Vif, Vpu, Vpr, Nef. À l'intérieur du 5' LTR, se retrouve le promoteur du VIH qui contient une boîte TATA. L'organisation génomique des deux souches de VIH (1 et 2) est très similaire, comme



le montre la figure 2. Toutefois, dans le VIH-2 la protéine Vpu est remplacée par la protéine Vpx, et le génome du VIH-2 est légèrement plus long que celui de VIH-1. (van der Kuyl et Berkhout, 2012; Ryoo et al., 2014). Pour pouvoir générer tous les produits pour former les virions, l'ARN messager du VIH est très minutieusement épissé par la machinerie d'épissage cellulaire. Par la suite, les divers ARN messagers épissés différemment sont sortis du noyau et traduits par les ribosomes cellulaires dans le cytoplasme où les précurseurs nouvellement synthétisés subissent un clivage protéique pour former les protéines virales finales.



**Figure 2. Schéma des génomes des provirus VIH-1 et VIH-2.** Les génomes comprennent des gènes pour les protéines structurales *gag*(rose), *pol*(orange), *env*(vert pâle), accessoires, *vif*, *vpr*, *vpu*(lavande), et *nef*(bleu pâle), et régulatrices dont *tat*(vert foncé) et *rev*(mauve). Les LTRs sont présents aux deux extrémités 5' et 3'. (Schéma adapté de LANL)

### **1.1.4 Affaiblissement du système immunitaire**

#### **1.1.4.1 *Les cellules ciblées***

Les cibles majeures du VIH sont les lymphocytes T CD4+. Ces cellules appartiennent au système immunitaire adaptatif et elles défendent le corps humain des infections étrangères. Les lymphocytes T CD4+, aussi appelés auxiliaires, sont indispensables à la réponse immunitaire puisqu'elles assistent à la sécrétion des anticorps par les lymphocytes B, ainsi qu'à l'activation des cellules T cytotoxiques pour détruire les cellules infectées. Elles peuvent également activer les cellules myéloïdes, comme les macrophages, une autre cible du VIH, en sécrétant l'interféron- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) ainsi que des facteurs de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) pour éliminer le corps infectieux par phagocytose (Albert et al., 1998; Janeway et al., 2001). Les macrophages peuvent être infectés par le VIH durant leur différenciation dans la moelle rouge et aussi en tant que macrophages matures dans les tissus. Les monocytes circulant dans le sang peuvent également être infectés par le virus et ensuite se différencier en macrophages. Les autres cellules myéloïdes ciblées par le VIH sont les cellules dendritiques, qui sont des cellules présentatrices d'antigènes, les cellules microgliales qui constituent le système immunitaire du système nerveux centrale (Zhu et al., 2002; Garden GA, 2002; Clapham et McKnight, 2001; Kilaeski et al., 2009).

#### **1.1.4.2 *Les maladies associées au SIDA***

Avec un système immunitaire affaibli, les personnes atteintes du SIDA sont prédisposées aux maladies opportunistes. Ces dernières comprennent les infections bactériennes (la tuberculose, la pneumonie), virales (l'Herpès), fongiques (méningite cryptococcique, penicilliose) et protozoaires (toxoplasmose). En plus des maladies neurodégénératives, plusieurs types de cancers y sont également associés, entre autres, le lymphome des cellules B et le carcinome épidermoïde (UNAIDS 1998).

### **1.1.5 Protéines virales et leurs rôles**

#### **1.1.5.1 *Les protéines du gène gag***

p17 est la protéine de la matrice, c'est-à-dire que c'est elle qui relie la capsid à l'enveloppe virale. p24 est la protéine de la capsid dans laquelle se retrouve le génome du VIH, et les protéines p7 qui sont directement associées à l'ARN, formant la nucléocapsid. Le reste des protéines encodées dans le gène *gag*, p1, p2, et p6 sont produites pour aider les autres protéines virales à s'intégrer dans les nouveaux virions lors de la sortie de la cellule hôte (Freed EO, 1998).

#### **1.1.5.2 *Les protéines du gène pol***

##### **1.1.5.2.1 La rétro-transcriptase (RT)**

La RT est l'enzyme qui synthétise de l'ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN viral suite à la décapsidation. Elle contient également une activité de ribonucléase H (Rnase H) pour pouvoir dégrader l'ARN encore lié à l'ADN nouvellement synthétisé à la fin de la transcription inverse. Ainsi, les deux brins d'ADNc pourront d'associer pour continuer dans le noyau (Beilhartz et Götte, 2010).

##### **1.1.5.2.2 L'intégrase**

Cette enzyme a pour rôle d'intégrer le génome viral dans le génome de l'hôte. Avec une activité exonucléolytique, elle est capable de dégrader les extrémités 3' de l'ADNc nouvellement synthétisé pour ensuite pouvoir l'intégrer dans le génome de l'hôte grâce aux LTR placés en 5' et 3' du génome viral (Delelis et al. 2008). L'intégrase peut également interagir avec des protéines cellulaires pour protéger l'ADNc viral dans le noyau (Poeschla EM, 2008).

### 1.1.5.2.3 La protéase

Cette enzyme joue un rôle très important dans le cycle réplcatif du VIH, spécifiquement lors de la maturation des virions nouvellement produits. Puisque les protéines des gènes *gag* et *pol* sont souvent produites sous forme de polypeptides précurseurs, la protéase doit cliver les polypeptides pour générer les protéines matures. Ces protéines fonctionnelles composeront alors la capsid virale, ainsi que celles qui se retrouveront dans les virions (Coffin et al., 1997).

### 1.1.5.3 Les protéines du gène *env*

L'enveloppe virale est composée de glycoprotéines qui sont encodées dans ce gène. Les glycoprotéines gp120 et gp41 sont exprimées sous la forme d'un précurseur, gp160. Pour pouvoir former des particules virulentes, le clivage endoprotéolytique de gp160 est strictement nécessaire et est fait par des endopeptidases cellulaires de la famille des kexine/subtilisine dans le cytoplasme, proche de la membrane plasmique. De plus, les précurseurs gp160 échappent au clivage cytoplasmique sont repris par une autre protéase cellulaire, nommée plasmine ou plasminogène, dans l'espace extracellulaire (McCune et al., 1988; Okumura et al., 1998). Une fois produites, gp120 et gp41 sont placées dans l'enveloppe virale où elles serviront à reconnaître les récepteurs CD4+ et les corécepteurs CCR5 ou CXCR4 retrouvés à la surface des cellules cibles du VIH.

#### **1.1.5.4 *Les protéines accessoires***

##### **1.1.5.4.1 Nef/Vpu**

Elles servent à stimuler l'endocytose et la dégradation lysosomale des récepteurs CD4+ d'une cellule infectée en s'y liant pour éviter une multiplicité d'infection supérieure à un virus par cellule (Willey et al., 1992; Aiken et al., 1994).

##### **1.1.5.4.2 Vpr**

Cette protéine est présente dans le complexe de pré-intégration (formé de l'ADNc viral et de l'intégrase) et peut diriger ce dernier vers le noyau à l'aide de son signal de localisation nucléaire (NLS) et de son interaction avec la voie de transport nucléaire (Vodicka et al., 1997; Li et al., 2013).

##### **1.1.5.4.3 Vpx/Vif**

Elles servent à contrer les réponses antivirales par les facteurs de restrictions cellulaires, comme SAMHD1 et APOBEC3G, qui seront développés plus loin dans le texte (Stopak et al., 2003; Hofmann et al., 2012).

#### **1.1.5.5 *Les protéines régulatrices***

##### **1.1.5.5.1 Rev**

Cette protéine est produite à partir d'un ARN messenger (ARNm) viral complètement épissé. Elle agit en homo-tétramère et elle est impliquée dans la régulation de l'épissage de l'ARNm viral. Plus précisément, elle lie les transcrits non-

épissés et partiellement épissés par la séquence *Rev response element* (RRE) et les dirige à l'extérieur du noyau grâce à sa séquence d'exportation nucléaire (NES). Pour transporter les ARN viraux dans le cytoplasme, Rev se sert d'une voie de transport nucléaire utilisée par les petits ARN nucléaires (snRNA) et les ARNr 5S. Elle interagit également avec des hélicases d'ARN (Felber et al., 1990; Zapp et al., 1991; Fischer et al., 1995; Naji et al., 2012).

#### 1.1.5.5.2 Tat

Cette protéine nucléaire et nucléolaire est essentielle à la réplication du VIH. Elle est une des premières protéines produite à partir de l'ARNm viral complètement épissé à cause de son rôle indispensable dans l'élongation de la transcription du génome viral. Tat se lie à une structure secondaire en forme de bourgeon du *Tat-Activation Response element* (TAR), le transcrit naissant du promoteur au 5' LTR viral (Roy et al., 1990). Tat est devenu une des protéines virales les plus étudiées et ses domaines protéiques ont été intensément cartographiés (figure 3). Tat est connue comme la protéine trans-activatrice du VIH car elle amène le complexe cellulaire de *positive elongation factor b* (P-TEFb,) en interagissant avec la Cycline T1 qui s'y trouve, au niveau de TAR (Garber et al., 1998; Fraldi et al., 2001). Le recrutement de ce complexe au site du promoteur du VIH résulte en une boucle d'activation de transcription en stimulant la pol II par le CDK9, contenu aussi dans P-TEFb.

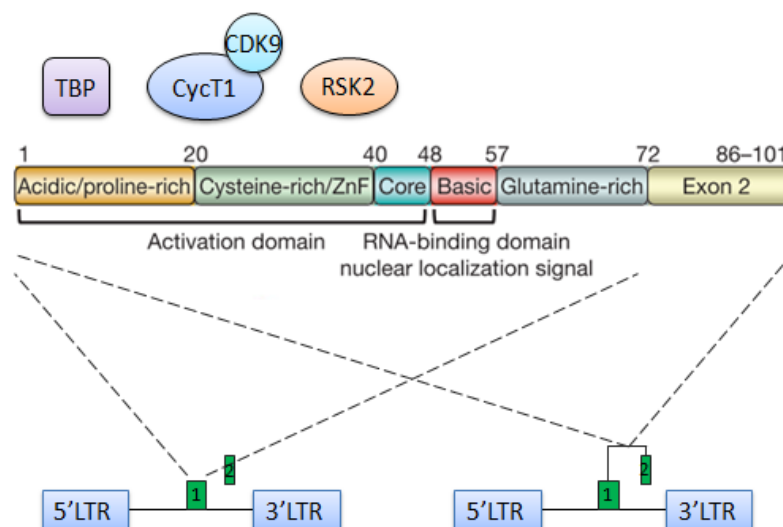
Tat peut également interagir avec des facteurs nucléaires et cellulaires d'une manière TAR-indépendante :

- *Tata binding protein* (TBP) pour favoriser le recrutement et la stabilisation des facteurs de transcription subséquents sur le promoteur du VIH (Kashanchi et al., 1996)
- p300 pour décondenser la chromatine en stimulant l'acétylation des histones présentes autour du promoteur du provirus (Wong et al., 2005)

- *90p ribosomal protein S6 kinase 2 (RSK2)* pour augmenter la traduction des protéines virales, par la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 (Hetzer et al., 2007)

Cette protéine peut influencer l'expression de plusieurs gènes régulateurs chez la cellule infectée d'une manière TAR-indépendante :

- Augmente l'expression des *tnf*  $\alpha$  et  $\beta$  pour activer la prolifération cellulaire des macrophages et lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectées, et, par association, la transcription du provirus (Brother et al., 1996)
- Augmente l'expression du proto-oncogène B cell lymphoma 2 (*bcl2*) pour inhiber l'apoptose des lymphocytes infectés lors de la réplication virale (Zauli et al., 1995)



**Figure 3. Schéma de la protéine régulatrice Tat du VIH-1.** Le domaine d'activation situé dans la partie N-terminale est composé d'une région riche en résidus acidiques et prolines (jaune), et une autre région riche en cystéines formant des doigts de zinc (vert), ainsi que le centre de la protéine (bleu). Le domaine d'activation est nécessaire pour l'interaction de Tat avec diverses protéines, dont Cycline T1, TBP, RSK2. Le domaine de liaison à l'ARN est situé entre les résidus 48-57 (rouge) et sert à lier la structure de bourgeon de l'ARN TAR. C'est également entre ces résidus que se trouve le signal de localisation nucléaire. Le domaine riche en glutamine (bleu-gris) complète la protéine Tat de 72 acides aminés (aa) produite par le premier exon. Tat 86-101aa, la forme qui inclut le deuxième exon, est celle qui est la plus fréquemment utilisée dans la recherche. (Modifié de Tahirov et al., 2010)

### 1.1.6 Le traitement ART et le cycle répliatif du VIH

Le développement des médicaments anti-rétroviraux qui composent cART a commencé en 1987. Il existe aujourd'hui six classes d'inhibiteurs du VIH: 1. Antagonistes de corécepteurs; 2. Inhibiteurs de fusion de l'enveloppe virale à la membrane cellulaire; 3. Inhibiteurs nucléosidiques de la rétro-transcriptase; 4. Inhibiteurs non-nucléosidiques de la rétro-transcriptase; 5. Inhibiteurs de l'intégrase; 6. Inhibiteurs de protéase. Depuis 1997, l'utilisation de ces drogues se fait en combinaison pour pouvoir contrôler et diminuer la propagation du virus à plusieurs niveaux de son cycle répliatif. Ci-dessous, quelques exemples de drogues utilisées



aujourd'hui dans les traitements de *highly active anti-retroviral therapy* (HAART), ainsi que leurs mécanismes d'action en lien avec les étapes de réplication virale, sont expliqués (Arts et Hazuda, 2012).

#### **1.1.6.1 L'entrée du VIH dans sa cellule cible**

Les particules virales portent des glycoprotéines à la surface de leur enveloppe, telles que gp120 et gp41. Lorsque la glycoprotéine gp120 interagit avec le récepteur cellulaire CD4+ d'un lymphocyte T, elle subit un changement de conformation qui exposera la glycoprotéine gp41. Cette dernière pourra alors s'insérer dans la membrane cytoplasmique de la cellule pour rapprocher le virion de sa cible et encourager la fusion des deux membranes. Sous un régime de ART, une protéine soluble T-20 (Roche et Trimeris, 2003) se lie au gp41 et empêche son insertion dans la cellule cible (Lalezari et al., 2003).

De plus, l'association du récepteur CD4+ doit être complétée par l'interaction de gp120 avec des corécepteurs retrouvés sur le lymphocyte pour avoir une fusion efficace (Coakley et al., 2005). En fait, les souches de virions qui ont des préférences pour les corécepteurs CXCR4 retrouvés principalement sur les cellules T CD4+ et les macrophages sont nommés T-tropiques et sont connues comme des virus X4. D'autres parts, les souches interagissant avec les corécepteurs CCR5 des cellules immunitaires sont M-tropiques, donc des virus R5 (Berger et al. 1998). La drogue Maraviroc (Pfizer 2007) agit en tant qu'antagoniste chimique du corécepteur CCR5 en s'y liant et inhibant son interaction avec les glycoprotéines de surface du virus (Lieberman-Blum et al., 2008; Briz et al., 2006).

### 1.1.6.2 *La transcription inverse*

Une fois que l'enveloppe virale se fusionne à la membrane cellulaire, le contenu du virus est libéré dans le cytoplasme, notamment les deux copies de son génome en ARN simple brin, souvent identiques, qui sont immédiatement rétro-transcrites en ADNc par la rétro-transcriptase virale (Moore et Hu, 2009). À cette étape, il existe deux classes de drogues qui viennent inhiber la réplication du VIH, soit les inhibiteurs nucléosidiques (ou nucléotidiques) et les inhibiteurs non-nucléosidiques (NRTI et NNRTI). Les NRTI utilisés, comme Tenofovir et emtricitabine (Gilead 2004), sont activés par des kinases cellulaires et peuvent s'insérer dans le site actif de la RT virale. Ainsi, la RT ne pourra plus incorporer les déoxynucléotides triphosphates (dNTPs) cellulaires et la synthèse de l'ADNc sera arrêtée (Menéndez-Arias, 2008). Cependant, les mutations comme les *thymidine analog mutations* (TAM) dans la RT virale va favoriser l'association de l'enzyme à une molécule d'ATP qui excisera le NRTI intégré. Ce type de mutation fait en sorte que la RT puisse développer une résistance aux NRTI qui sont des analogues de thymidine, dont azidothymidine (AZT) (Tamalet et Colson, 2006; Clavel F, 2004).

Les NNRTIs, comme efavirenz (BMS 2007), sont des petites molécules synthétiques qui s'insèrent dans le site catalytique de la RT et changent sa conformation protéique. Ceci a pour effet de considérablement ralentir la synthèse de l'ADNc, mais n'affecte pas l'accès des dNTPs cellulaires à l'enzyme (Feng et al., 2009; Molina et al., 2011). Les mutations ponctuelles comme K65R et M184V dans la rétro-transcriptase virale vont favoriser l'incorporation des dNTPs cellulaires et diminuer l'association des NNRTIs au site actif de la RT virale (Tamalet et Colson, 2006; Feng et al., 2009).

### 1.1.6.3 *L'intégration de l'ADNc dans le génome de la cellule hôte*

L'ADNc nouvellement synthétisé est couplé à des protéines virales, dont une multimère de l'intégrase, la protéine virale Vpr, ainsi que des protéines cellulaires, pour former le complexe de pré-intégration (CPIIn). Ce complexe est transloqué dans le noyau par le biais d'une interaction entre les nucléoporines et l'intégrase virale (Woodward et al., 2009; Ao et al., 2011). Cette translocation est également facilitée par le signal de localisation nucléaire présent sur la protéine Vpr (Vodicka et al., 1997). L'association précoce de l'intégrase avec la protéine cellulaire LEDGF/p75 dans le cytosol permet au CPIIn d'être protégé contre la dégradation nucléolytique une fois rendu dans le noyau. L'addition de ce dernier facteur cellulaire permettra à l'intégrase virale de sélectionner des groupes de gènes hôtes fortement exprimés pour y insérer le génome du VIH (Poeschla EM, 2008; Le Rouzic et al., 2013; Christ et Debyser, 2013).

Le site d'insertion du génome viral dans le génome de son hôte était longtemps considéré aléatoire. Cependant, les découvertes faites dans les quinze dernières années démontrent que le VIH pouvait justement choisir son site d'intégration dans le génome, et ceci à des endroits hautement transcrits (Schröder et al., 2002; Wang et al., 2007; Malderelli et al., 2014). En effet, il a récemment été conclu que la sélection du site d'intégration ne dépend pas seulement de l'activité transcriptionnelle, mais également de la localisation des gènes dans le noyau. Les gènes qui sont retrouvés proches des pores nucléaires, contenant des marqueurs de chromatine en transcription active, sont préférentiels à l'intégration du génome viral (Marini et al., 2015).

Avant la migration du CPIIn dans le noyau, l'intégrase, par le biais de son activité endonucléolytique, va cliver les extrémités 3' des deux brins l'ADNc viral. Cette modification permettra à l'ADNc de s'insérer dans le génome de l'hôte plus efficacement par transfert de brin en utilisant les LTRs situés à chaque extrémité du génome viral (Delelis et al. 2008). Une fois intégré dans le génome de la cellule cible, le génome viral se nomme provirus. La drogue Raltegravir (Merck 2007) est un composé chimique, retrouvé dans la thérapie combinatoire HAART et qui est

spécifique à l'inhibition de l'intégrase virale. Son mécanisme d'action est d'empêcher l'étape du transfert de brin en inhibant l'activité de phosphoryltransférase de l'enzyme virale (Temesgen et Siraj, 2008).

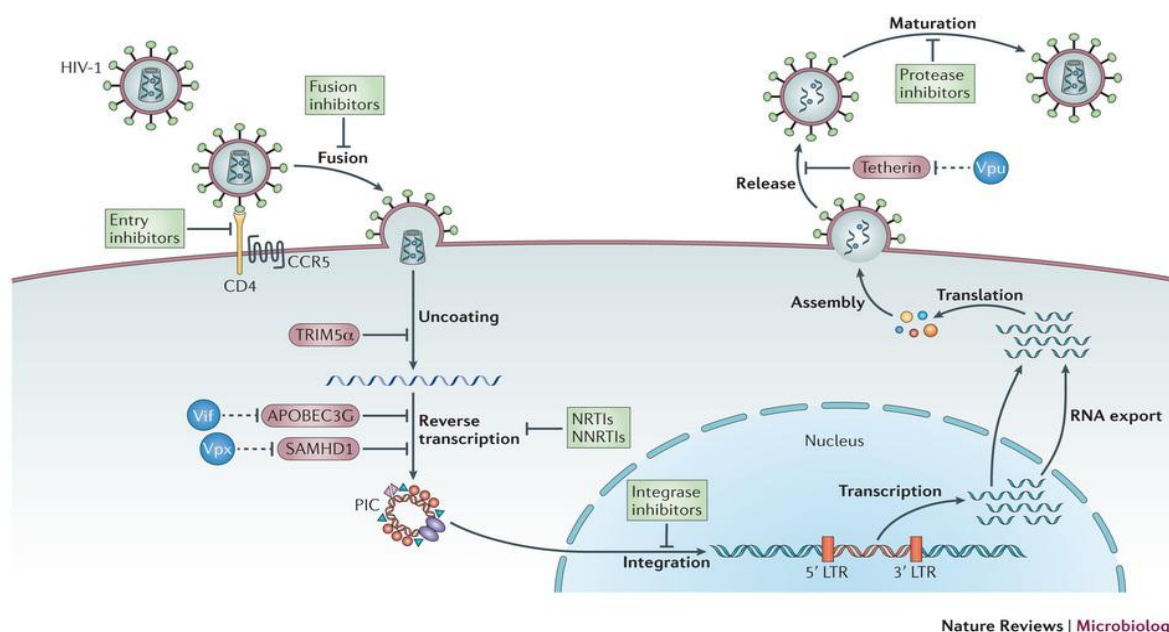
#### **1.1.6.4 La sortie et maturation des virions VIH**

Une fois rendus dans le cytoplasme, les transcrits viraux sont traduits par les ribosomes cellulaires pour produire les protéines virales telles que les protéines associées à la virulence du VIH, la protéase, et sa protéine trans-activatrice de transcription, Tat (Pollard et Malim, 1998).

La protéine Tat va retourner dans le noyau, au site d'intégration du VIH, pour accélérer la transcription du génome viral complet en formant une boucle de trans-activation grâce à son interaction avec l'ARN TAR, ainsi que le facteur d'élongation de la transcription cellulaire, P-TEFb (Muniz et al., 2010; Garber et al., 1998). Les protéines virales sont activement traduites et servent à assembler la capside virale qui contiendra deux copies d'ARN du génome viral entrelacées sous forme de complexe ribonucléo-protéique (Moore et Hu, 2009). Ces poly-protéines nécessitent une maturation par protéolyse pour produire les protéines finales, telles que les protéines de la capside virale, ainsi que la RT et l'intégrase qui feront partie des nouveaux virions.

L'assemblage des virions a lieu à proximité de la membrane cytoplasmique, avec une concentration très élevée des protéines virales Gag (p1, p2 et p6) ainsi que les protéines de la matrice et la capside (p17 et p24, respectivement) pour que les virions nouvellement formés puissent sortir de la cellule par bourgeonnement facilité par la protéase virale (Coffin et al., 1997; Sundquist et Kräusslich, 2012; van der Kuyl et Berkhout, 2012). L'étape de maturation est ciblée par les inhibiteurs de protéases, comme Tipranavir (BI 2005). L'utilisation d'inhibiteurs peptidiques pour bloquer la

protéase se montrait inefficace puisque l'enzyme pouvait facilement contenir des mutations qui délogeaient l'inhibiteur du site actif. Cependant, Tipranavir est un inhibiteur non-peptidique qui utilise beaucoup moins d'énergie pour s'insérer dans le site actif de la protéase pour favoriser leur interaction même en présence de nouvelles mutations, ainsi bloquant l'accès aux précurseurs de protéines virales. De cette façon, les virions libérés dans le sang, et même dans la matrice extracellulaire, ne sont pas complètement fonctionnels et ne peuvent pas infecter les prochaines cellules cibles efficacement (Hughes et al., 2011).



**Figure 4. Schématisation du cycle réplcatif du VIH.** Les étapes de réplication virale sont montrées : entrée, décapsidation, réverse-transcription, translocation au noyau, intégration, transcription, traduction et sortie par bourgeonnement suivi de maturation des virions. Les divers classes de médicaments contrant la réplication viral sont montrées en cases vertes. Les facteurs cellulaires anti-viraux (APOBEC3G, TRIM5α, SAMHD1, Tetherin) sont représentés en mauve. Les protéines virales (Vif, Vpx, Vpu) qui inhibent ces facteurs cellulaires sont montrées en bleu. (Tiré de Barré-Sinoussi et al., 2013)

## 1.2 L'ÉVASION DU SYSTÈME IMMUNITAIRE HÔTE PAR LE VIH

Le VIH est un virus qui échappe très facilement à la réponse immunitaire par le biais de deux mécanismes : 1) l'hypermutation du génome viral qui empêche la production d'anticorps spécifique contre les virions, 2) l'établissement des réservoirs latents dans divers sanctuaires du corps humain.

### 1.2.1 L'hypermutation ou l'hypervariation du génome viral

#### 1.2.1.1 *Les causes virales*

Ce premier mécanisme d'évasion est surtout causé par la RT virale qui a une fidélité d'au moins  $10^6$  fois inférieure à n'importe quelle autre polymérase connue. Effectivement, le rétro-transcriptase fait partie des polymérases qui produisent un nombre très élevé d'erreurs dans l'ADNc qu'elle synthétise lors de la transcription inverse (Bebenek et al., 1989). Ce phénomène de mutations peut être augmenté lors de la présence d'une RT qui est elle-même mutée dans le site actif de l'enzyme, mais également lorsque la cellule est en carence de certains nucléotides (Tamalet et Colson, 2006). De cette façon, le transcrit contenu dans le virion qui est entré dans la cellule hôte sera différent de celui qui sortira après l'infection. D'ailleurs, des facteurs cellulaires, élaborés dans le prochain paragraphe, peuvent également causer l'hypermutation du génome viral.

#### 1.2.1.2 *Les causes cellulaires*

##### 1.2.1.2.1 Les protéines APOBECs

Les protéines appartenant à la famille des enzymes désaminases comme APOBEC (APOBEC3F, APOBEC3G et autres) sont utilisées par la cellule comme

système de défense contre une infection par le VIH. APOBE3G est en fait sélectivement exprimé dans le cytoplasme des lymphocytes T quiescents (Stopak et al., 2003). Ces protéines peuvent reconnaître un simple-brin d'ADN complémentaire (ADNc) naissant lors de la transcription inverse du génome viral et désaminer les cytosines en uraciles. Ce mécanisme de restriction a pour but d'introduire des mutations du type  $G \rightarrow A$  dans le brin complémentaire et par la suite changer l'information génétique du virus. L'accumulation des mutations dans l'ADNc du VIH pourra également l'amener à la dégradation dans le cytoplasme. La protéine APOBEC3G est aussi connue pour s'incorporer dans les nouveaux virions et désaminer les cytosines du prochaine ADNc dans la nouvelle cellule hôte (Harris et al., 2004; Lecossier et al., 2003).

Cependant, la protéine virale Vif empêche l'interaction des APOBECs et les brins d'ADNc naissants, ainsi que son intégration dans les nouveaux virions, en causant leur dégradation par le protéasome. Ceci va minimiser la désamination mais ne va pas la supprimer complètement. De cette manière, des mutations s'introduisent dans la copie du génome qui est incorporée dans le génome de l'hôte (Stopak et al., 2003).

#### 1.2.1.2.2 SAMHD1

Une deuxième protéine présente dans la réponse immunitaire innée de la cellule est le SAMHD1, une désoxynucléoside triphosphohydrolase (dNTPase). Elle est exprimée dans les cellules myéloïdes non-cyclantes, comme les macrophages et les cellules dendritiques. Ces cellules sont arrêtées à la phase G2/M du cycle cellulaire, ce qui est très commun dans une infection par le VIH (Groschel et Bushman, 2005). SAMHD1 va inhiber la transcription inverse du VIH en causant une carence de désoxynucléosides triphosphate (dNTPs) dans le cytoplasme. Ceci est fait par l'hydrolyse des dNTPs en désoxynucléosides et des triphosphates. Pendant cette carence de dNTPs, la RT virale incorporera des nucléotides dans l'ADNc de façon

plus aléatoire, créant ainsi des mésappariements de bases qui deviendront des mutations dans la séquence codante SAMHD1 contient également une activité ribonucléase qui dégrade l'ARN viral lors de la transcription inverse (van der Kuyl et Berkhout, 2012; Ryoo et al., 2014).

La protéine accessoire virale Vpx, exprimée par la souche VIH-2, va inhiber l'action de SAMHD1 en s'y liant et favorisant sa dégradation par le protéasome ce qui mène à un rétablissement des niveaux de dNTPs dans la cellule (Hofmann et al., 2012). Par contre, la souche VIH-1 ne contient pas de protéine Vpx, ce qui cause un arrêt ou ralentissement considérable du cycle réplcatif dans les macrophages et cellules dendritiques, menant à une production très minime de virions (Hrecka et al., 2011).

#### **1.2.1.3 Effets de l'hypermutation génomique**

Curieusement, le génome des lentivirus a tendance à être biaisé dans sa composition. Les analyses génétiques montrent que ces types de virus sont plus enclins à avoir un génome riche en adénosine (A). Ceci est dû au fait que ce nucléotide ne fait que deux liens chimiques, avec un uracile, et que ce sont des liens assez faibles pour limiter la formation des structures secondaire d'ARN lors de la transcription inverse (van der Kuyl et Berkhout, 2012). Toutefois, les régions hypermutées sont celles riches en cytosines facilement désaminées, et elles se retrouvent davantage dans la séquence qui code pour les glycoprotéines formant l'enveloppe virale (Armitage et al., 2012). Puisque les glycoprotéines de surface virale servant d'antigène sont modifiées, les virions nouvellement synthétisés pourront échapper à la réponse immunitaire à l'extérieur de la cellule hôte en contrant les anticorps initialement produits. Ces mutations peuvent également influencer la virulence du VIH, augmenter la pathogénicité du virus, de même que mener au développement des résistances aux médicaments d'ART (Hahn et al., 1986).



### 1.2.2 La latence

Le deuxième mécanisme d'évasion du VIH repose sur le fait que ce virus puisse infecter des cellules du système immunitaire et entrer en état de latence. En fait, pendant une infection aiguë, les lymphocytes T activés sont infectés et produisent un nombre exponentiel de virions qui peuvent circuler dans le système sanguin de l'hôte et infecter des nouvelles cellules cibles (Okoye et Picker, 2013). Ces cellules produisant activement des virions peuvent être ciblées par les traitements anti-rétroviraux, contrôlant ainsi la propagation de l'infection dans le corps du patient en les éliminant. Toutefois, pendant l'infection initiale, les cellules myéloïdes, comme les monocytes et les cellules dendritiques, ainsi qu'une très petite population de lymphocytes T CD4+ auxiliaires qui se différencie en cellules T mémoire, sont infectées et celles-ci ne produisent pas un taux détectable de virions (Chun et al., 1995; Eisele et Siliciano, 2012; Archin et al., 2014).

#### 1.2.2.1 *Qu'est-ce qu'un réservoir latent?*

Les lymphocytes T CD4+ mémoires et les cellules myéloïdes infectées peuvent migrer vers des compartiments du corps qui sont inatteignables par les drogues ART, dont le cerveau, les testicules chez l'homme, ainsi que le tractus gastro-intestinal. De plus, les testicules sont considérés des sanctuaires puisqu'ils sont imperméabilisés contre les drogues ART par une barrière sang-testicule (Le Tortorec et Dejucq-Rainsford, 2009). À ces endroits, les lymphocytes T CD4+ mémoires centrales (T<sub>CM</sub>) quiescents ont des demi-vies de plusieurs années et maintiennent une population de cellules infectées par une prolifération antigène-dépendante. Ces cellules peuvent également se différencier en lymphocytes T CD4+ mémoires transitionnelles quiescents (T<sub>TM</sub>). Celles-ci peuvent établir un réservoir cellules contenant un provirus latent par une prolifération homéostatique, c'est-à-dire qu'elles survivent longtemps avec un taux de renouvellement cellulaire très faible, même sous un régime de traitement ART (Chomont et al., 2009; Ben Haji et al., 2013). Le cerveau humain est

également un sanctuaire de cellules myéloïdes infectées, dont les monocytes différenciés en microglie, grâce à la barrière hémato-encéphalique (Saksena et al., 2010). De cette manière, le taux de virions produits reste en-dessous du seuil de détection (50 copies/ml de sérum) parce que les cellules qui composent ces réservoirs ont une activité transcriptionnelle basale très faible. Par définition, on les caractérise comme des cellules latentes (Van Lint et al., 2013).

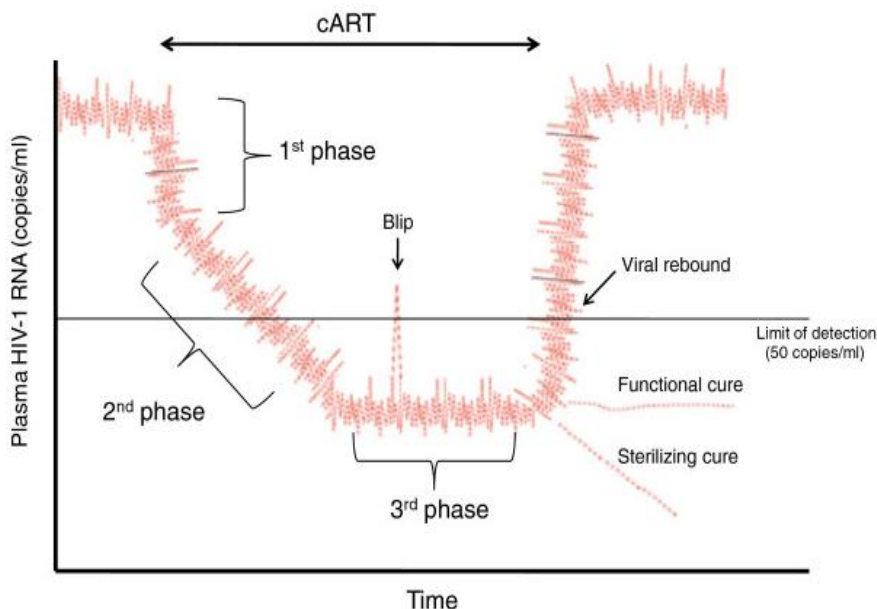
#### **1.2.2.2 *La latence, l'obstacle à l'éradication du VIH par ART***

Lorsqu'un patient cesse de suivre le traitement ART, une remontée de la virémie est observée dès les deux premières semaines. Ceci est dû au fait que les réservoirs latents sont réversibles et qu'une stimulation du système immunitaire en absence des drogues ART cause une activation des cellules infectées, activant ainsi la production des virions (Dahabieh et al., 2015). Ces effets obligent le patient à suivre le traitement ART tout au long de sa vie. Conséquemment, la capacité des cellules infectées à persister dans le corps humain malgré la présence de médicaments montre que la latence est une barrière à l'éradication de la maladie de SIDA/VIH. De plus, la pression du traitement ART pousse le VIH à développer plus en plus de résistance aux drogues et provoque l'accumulation de plusieurs effets secondaires liés à ces drogues. Ensemble, ces faits montrent que quand bien même l'ART soit la meilleure solution actuellement, la poursuite de ce type de traitement, pour une durée indéterminée, est irréaliste et souligne l'urgence de trouver un remède permanent (Deeks SG, 2012).

#### **1.2.2.3 *Les stratégies de guérison***

Quand le traitement ART fut appliqué pour la première fois, en observant la diminution de la virémie en phases, il a été calculé qu'un patient n'aurait à suivre un régime d'ART que pendant 2-3ans pour éradiquer tous les corps infectieux de son système. En effet, dans la première phase du traitement, la virémie décline de presque

99%, à cause de la dégradation des virions en circulation et la mort rapide des lymphocytes T infectés producteurs actifs de virus. En fait, la forte expression des protéines virales cause une fragmentation de l'ADN de l'hôte et mène à l'apoptose de la cellule lors de la sortie des virions (Laurent-Crawford et al., 1991; Perelson et al., 1997). La deuxième phase d'élimination virale, sous le régime ART, est plus lente puisqu'elle comprend surtout le déclin des macrophages et cellules dendritiques, qui ne sont pas affectés par les effets cytopathiques du VIH, ainsi que les lymphocytes T partiellement activés qui ont tous une durée de vie plus longue (Bergamini et al., 1996; Ruelas et Greene, 2013). Par contre, cette phase de déclin est suivie par une phase stationnaire qui garde le niveau de virions produits par les cellules infectées en-dessous d'un seuil de détection sans l'éliminer. Ceci est la phase pendant laquelle les réservoirs latents de cellules survivent avec des demi-vies de plus de 44 mois, ce qui rend l'éradication du VIH possible après 73 ans de traitement ART. Cette durée irréaliste est la raison pourquoi ce type traitement seul ne semblait plus être une stratégie de guérison permanente. Par conséquent, des méthodes alternatives ont été proposées par des chercheurs qui visent à éliminer la latence virale ou l'utiliser pour arrêter la progression du VIH sans avoir besoin de la continuation du traitement ART (Van Lint et al., 2013; Siliciano et Greene, 2011).

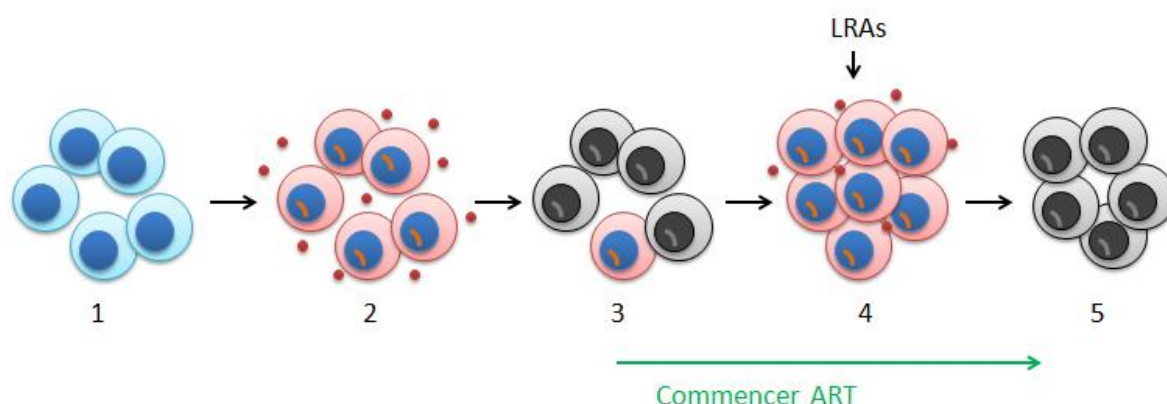


**Figure 5. Changement dynamique de la virémie chez les individus séropositifs sous un traitement ART combinatoire (cART).** La déplétion de virions se montre en plusieurs phases durant un traitement anti-rétroviral. Phase 1 : déclin rapide, causé par déplétion exponentielle de virions libres et des lymphocytes T CD4+ actifs et producteurs de virions. Phase 2 : diminution lente, causée par la déplétion des cellules infectées avec une durée de vie plus longue, ex. macrophages. Phase 3 : la phase stationnaire est causée principalement par les réservoirs latents de cellules qui sont partiellement réactivées et produisent donc une quantité très faible, mais stable, de virions (en dessous du seuil de détection de 50 copies/ml de sérum). La persistance de cellules infectées avec une longue durée de vie peut également contribuer à cette basse virémie. Une forte remontée de virémie est observée chez un patient arrêtant cART. Les stratégies de remèdes sont illustrées sur cette figure, montrant une guérison fonctionnelle gardant le niveau de virions asymptomatique et une guérison stérilisante qui déplete totalement la quantité de virions dans le corps. Les deux types de remèdes visent une discontinuité du traitement cART. (Tiré de Van Lint et al., 2013)

#### 1.2.2.3.1 La méthode stérilisante : *Shock and Kill*

Cette approche nécessite la réactivation robuste des cellules latentes dans le but de purger les réservoirs en éliminant les cellules infectées. Pour se faire, plusieurs drogues, nommées *Latency Reversing Agents* (LRAs), sont utilisées (Deeks SG, 2012; Xing et Siliciano, 2014). Elles agissent sur plusieurs voies d'activation des cellules

immunitaires ainsi que des voies d'activation de transcription. Par exemple, les esters de phorbol activateurs de la voie de la protéine kinase C (PKC), un des groupes de LRAs les plus efficaces, vont déclencher la cascade d'activation de l'hétérodimère de NF $\kappa$ B qui pourra à son tour activer la transcription du provirus VIH (Darcis et al., 2015; Laird et al., 2015). D'autre part, les inhibiteurs d'histone désacétylases (HDAC) et d'histone méthyle-transférases (HMT) vont agir directement sur le remodelage de la chromatine, ce qui va rendre le promoteur du VIH plus accessible aux facteurs de transcription (Wei et al., 2014).



**Figure 6. Stratégie de déplétion de la virémie par la stérilisation des réservoirs latents.** Cette stratégie vise à purger les réservoirs en combinant les LRAs et le traitement ART. 1. Les cellules immunitaires saines. 2. Une infection active par le VIH causant l'incorporation du génome viral en orange dans le noyau bleu des cellules infectées, en rouge. 3. La mort de la plupart des cellules infectées par les effets cytopathiques de la production de protéines virales. La cellule infectée, en rouge, échappe à la mort en n'étant que partiellement activée ou non-affectée par les effets cytopathiques. C'est à ce moment que commence le traitement ART. 4. Les cellules résistant à la mort par apoptose vont établir un réservoir latent qui sera réactivé par les LRAs et le VIH sera obligé de sortir de sa latence. Les cellules infectées seront épuisées et les virions ne pourront plus infecter de nouvelles cibles sous le régime d'ART. (Schéma adapté de Ruela et Greene, 2013)

Les cellules réactivées vont activement synthétiser l'ARN messager (ARNm) viral et produire les protéines virales nécessaires pour la fabrication de nouveaux virions. Elles vont également être assujetties aux effets cytopathiques qui accompagnent une infection virale active par le VIH, et vont donc mourir (voir figure 6). Cependant, puisque le patient sera toujours sous un régime de cART, les virions nouvellement libérés dans le corps ne pourront pas causer des infections *de novo* et par conséquent, seront eux aussi éliminés (Deeks SG, 2012). Bien que les activateurs de transcription puissent réactiver la latence dans les réservoirs, leur utilisation seule ne permet pas une élimination suffisante des cellules réactivées. Il est important de stimuler une réponse immunitaire supplémentaire, comme l'activation des cellules T CD8+ par l'ajout des peptides Gag, qui reconnaîtront et élimineront les lymphocytes T CD4+ réactivés (Shan et al., 2011). De cette manière, les réservoirs seront tous épuisés, donc il ne devrait plus avoir de risques d'une remontée de virémie lorsqu'un patient arrêtera les traitements antiviraux.

La stratégie *Shock and Kill* nécessite encore beaucoup de raffinement au niveau des candidats de cibles cellulaires pour les agents thérapeutiques. Plus précisément, il est important que plus d'études soient faites sur la spécificité des cibles cellulaires à l'activation de l'expression du provirus sans toutefois avoir un effet négatif sur leur rôle biologique. L'inhibiteur des HDAC, l'acide hydroxamique suberoylanilide (SAHA), communément connu sous ses formes variées, ex. *Vorinostat* et *Romidepsin*, est une des molécules les plus utilisées comme LRA de nos jours pour réactiver la transcription virale dans les cellules latentes (Wei et al., 2014). Cependant, ce médicament ne semble pas faire la différence entre une cellule infectée et une cellule saine, et n'affecte pas que les HDACs retrouvés seulement au niveau du promoteur du VIH. Son effet se répand jusqu'aux histones désacétylases posés sur le génome entier d'une cellule, et ceci cause une dérégulation inévitable de l'expression génique globale. Pour éviter justement ce type de dérégulation, l'élaboration d'agents thérapeutiques plus spécifiques est nécessaire, et c'est pour cette raison que ce type de remède permanent tarde à être inclus dans les essais cliniques (Eisele et Siliciano, 2012).

### 1.2.2.3.2 La méthode fonctionnelle

Cette approche vise à transformer le provirus en rétrovirus endogène. La réalisation de ce concept est encouragée par des individus séropositifs qui peuvent contrôler leur infection sans développer de SIDA et sans avoir recours aux traitements antirétroviraux : des « contrôleurs d'élite » (EC). Ces personnes montrent un niveau élevé de réponses immunitaires spécifiques aux peptides du VIH, soit par le système immunitaire inné ou adaptatif. De plus, les provirus VIH détectés dans les analyses de qPCR de ces individus montrent également plusieurs mutations qui atténuent l'aptitude biologique des virions produits (Deeks et Walker, 2007). Ces mutations se retrouvent dans les séquences codant des protéines accessoires et régulatrices, comme Vif et Rev. Étonnamment, il existe un individu infecté et asymptomatique depuis plus de deux décennies, sans traitement ART. Ceci suggère que le patient a développé un système immunitaire qui contrôle très efficacement l'infection du VIH. De plus, le provirus analysé dans ses cellules comporte également les mutations qui produisent des virus incompetents (Colson et al., 2014).

En fait, plusieurs organismes utilisent l'incorporation de matériel génétique étranger dans leur propre génome pour se protéger contre des infections subséquentes. Par exemple, les bactéries, et même les archées, utilisent le système de CRISPR/Cas9 pour cliver un fragment d'ADN étranger venant de bactériophages ou autres bactéries, par conjugaison (Fineran et Charpentier, 2012). Ce fragment est par la suite intégré dans un locus de CRISPR, qui par transcription va générer un ARNm qui servira à trouver les séquences d'ADN étrangères complémentaires, pendant une deuxième infection, et à les éliminer avec l'endonuclease Cas9 (Bassett et Liu, 2014). Le système de CRISPR/Cas9 est actuellement étudié dans le contexte de stratégie d'endogénéisation du VIH en utilisant l'endonuclease Cas9 en complexe avec un ARN guide contre le VIH pour introduire des mutations dans le promoteur du provirus, rendant ainsi sa réplication impossible. Ce système peut également être exploité pour complètement exciser le provirus dans des lignées cellulaires infectées (Ran et al., 2013; Ebina et al., 2013).

Chez l'humain même, 8% du génome est composé de rétrovirus endogénisés au cours de l'évolution. Un exemple classique serait la présence et la réactivation locale de la protéine virale syncytine lors de la formation des syncytiotrophoblastes dans le placenta humain (Liu et al., 2011; Mi et al., 1999). Ces observations mènent à l'hypothèse que la latence du VIH ne serait pas un obstacle à son éradication, mais plutôt la clé au développement d'une protection contre une nouvelle infection.

#### **1.2.2.4 La clé de la latence est dans la transcription virale**

Pour réaliser chacune des deux stratégies proposées, il est tout d'abord important de contrôler l'expression du génome viral. Effectivement, la première stratégie, le *Shock and Kill*, requiert l'activation abondante de la transcription virale pour sortir le virus de la latence dans les réservoirs. La deuxième méthode fonctionnelle, est basée sur la répression totale, sinon strictement réglementée, de la transcription par les facteurs cellulaires humains afin de développer un rétrovirus endogène. Le contrôle permanent de la production viral chez un patient le permettra de maintenir une virémie en-dessous du seuil de détection de 50 copies/ml de sérum et empêcher la transmission du virus aux autres. Pour les deux stratégies la régulation de la transcription du provirus VIH est un facteur incontournable pour éliminer ou utiliser la latence virale dans le but de trouver un remède permanent à l'infection au VIH.



## 1.3 LA TRANSCRIPTION

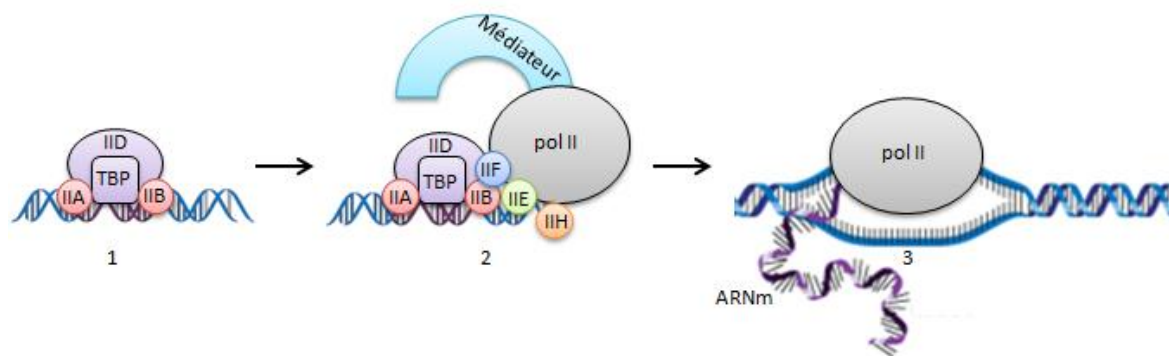
### 1.3.1 La transcription générale cellulaire

La transcription cellulaire commence par une cascade de recrutement de facteurs cellulaires au niveau du promoteur d'un gène. Le promoteur est une séquence d'ADN placée en amont des gènes codant pour des protéines ou des ARN non-codants. En fait, l'activité du promoteur est sujette à la régulation par des séquences, ou éléments, d'ADN supplémentaires proximales, telles que les séquences activatrices, ou distales, comme les amplificateurs et répresseurs. Les séquences proximales, par définition, sont placées à proximité des promoteurs et ont un effet direct sur le recrutement des facteurs de transcription. Par contre, les éléments distaux peuvent être placés à des kilobases du promoteur. Un élément amplificateur ou répresseur placé sur un chromosome différent peut avoir un effet de régulation sur l'expression d'un gène grâce à l'organisation du génome eucaryote dans le noyau (Maston et al., 2006).

La séquence du promoteur est reconnue par des facteurs de transcription qui lient directement l'ADN dans le but de recruter d'autres facteurs cellulaires, ainsi que des complexes composés d'enzymes qui vont réguler, d'une manière très dynamique, la transcription d'un gène (Spitz et Furlong, 2012). Les facteurs de transcription vont également recruter les holoenzymes, les ARN polymérases, au promoteur pour initier la transcription. Dans les cellules eucaryotes, il existe trois ARN polymérases : pol I, pol II et pol III. Alors que les pol II produisent les ARNm, qui codent pour des protéines, et quelques petits ARN nucléaires (snARN), les pol I et pol III produisent strictement des transcrits d'ARN non-codant. Plus précisément, l'ARN polymérase I transcrit les ARN ribosomiaux (ARNr) 18, 5.8 et 28S dans le nucléole, tandis que la polymérase III va transcrire les ARN de transfert (ARNt), l'ARNr 5S ainsi que quelques snARN (Cooper GM, 2000). Pour l'intérêt de ce mémoire, je vais me concentrer sur les étapes de l'initiation et d'élongation de la transcription pol II - dépendante.

### 1.3.1.1 *L'initiation*

Les promoteurs cellulaires qui sont placés directement en amont des gènes dépendants de la pol II contiennent souvent une séquence riche en adénosines et thymines, nommée la boîte TATA. Cette séquence est nécessaire pour recruter les facteurs du complexe de pré-initiation (PIC) de la transcription qui sont associés à la pol II, dont la TBP qui fait partie du facteur de transcription II D (TFIID). Le recrutement de TFIID, composé justement de TBP et des ses facteurs associés (TAFs), va déclencher la cascade de recrutement mentionnée plus haut. En effet, TFIID va, à son tour, recruter les autres facteurs de transcription TFIIA et TFIIB qui eux augmenteront l'affinité du TBP pour la séquence d'ADN de la boîte TATA, voir figure 7 (Imbalzano et al., 1994). Ensemble, les facteurs IIA et IIB vont également recruter les facteurs TFIIF, TFIIIE, TFIIH, ainsi que l'ARN polymérase II. Ces derniers facteurs de transcription de la pol II, en association avec le TFIIB, assurent l'initiation de la transcription. Par exemple, le TFIIH possède une activité ATPase et hélicase qui lui permet de débiter la fourche de transcription en séparant les deux brins d'ADN d'une manière ATP-dépendante. Cette fonction est assistée par le facteur TFIIIE qui stimule les activités enzymatiques du TFIIH pendant l'initiation de la transcription. TFIIIE permet ainsi la transition entre l'initiation et l'élongation de la transcription (Dvir et al., 1997; Sainsbury et al., 2013). TFIIB est un facteur très important dans le PIC, puisqu'il détermine le site de départ de la transcription (TSS) en interagissant directement avec la pol II. Ce facteur peut suivre la pol II au tout début de l'élongation de la transcription et servir à séparer le nouveau transcrit synthétisé de l'ADN matrice. Alors que seul, le facteur TFIIF n'est pas essentiel à l'initiation de la transcription, son interaction avec TFIIB va stabiliser ce dernier et promouvoir le début de l'élongation (Cabart et al., 2011). Le dernier membre du PIC est le médiateur qui est un énorme complexe protéique, composé d'une panoplie de sous-unités. Il sert d'un échafaud pour les facteurs de transcription qui ne font pas partie du PIC, mais qui contrôlent tout de même l'expression des gènes. Recruté par les facteurs cellulaires du PIC liant le promoteur, le médiateur fait le lien entre les régulateurs et la pol II (Bernecky et Taatjes, 2012; Poss et al., 2013).



**Figure 7. Initiation de la transcription cellulaire pol II - dépendante.** Le recrutement séquentiel des facteurs de transcription est montré en trois étapes. 1. Association de TBP au promoteur, ADN en mauve, et recrutement de TFIID, TFIIA et TFIIB. 2. Assemblage du PIC complet comprenant l'addition des facteurs TFIIE, TFIIH, pol II et le médiateur, au niveau du promoteur. 3. L'initiation de la transcription marquée par la synthèse de l'ARNm naissant en mauve. (Schéma modifié à partir de Mutagenetix)

### 1.3.1.2 L'élongation

Une fois que la transcription est initiée, la pol II synthétise un court transcrit d'ARNm et s'arrête arrivée au site de pause. À cet endroit, en amont du nucléosome +1, composé d'ADN enroulé autour d'un octamère d'histones, la pol II est liée par le facteur d'élongation négatif (NELF) et un autre facteur cellulaire répresseur de l'élongation, DSIF. Avant de pouvoir poursuivre la transcription, il faut tout d'abord assurer que l'ADN du gène à transcrire est accessible. Ceci est fait par le recrutement des facteurs de remodelage de la chromatine, dont les histones acétyl-transférases (HAT) qui vont acétyler les histones du nucléosome pour relâcher l'ADN enroulé (Zhang et Reinberg, 2001). La libération de la pol II du site de pause, ainsi que son entrée dans la phase d'élongation de la transcription dépend du recrutement du facteur positif d'élongation, P-TEF b, composé d'une cycline (T1) et de la kinase CDK9. Ceci a lieu par le recrutement des activateurs de transcription comme NFκB ou Myc qui vont directement, ou par le biais de cofacteurs comme la protéine contenant un bromodomaine, BRD4, recruter P-TEFb au site de pause de la pol II. Si un tel

recrutement n'a pas lieu, il y aura une terminaison prématurée de la transcription et la pol II sera retirée du site de pause. Le transcrit naissant sera relâché par la pol II et dégradé par les ribonucléases du noyau (Jonkers et Lis, 2015).

Lorsqu'il y aura un recrutement réussi de P-TEFb, son rôle sera de phosphoryler les deux facteurs négatifs liés à la pol II, NELF et DSIF, et les déloger pour libérer la polymérase. Ensuite, CDK9, du P-TEFb, va hyperphosphoryler les sérines 2 et 5 du domaine C-terminal (CTD) de la pol II pour activer l'élongation de la transcription du gène. L'état hyperphosphorylé de la pol II va contribuer à la maintenir sur l'ADN tout au long de la transcription puisque la charge positive des molécules de phosphate sur le CTD sera attirée par la charge négative de l'ADN (Sims III et al., 2004).

### **1.3.2 La transcription du provirus VIH**

À l'intérieur du 5'LTR du génome du VIH se trouve son promoteur qui contient des séquences reconnues par NFκB et SP1 en amont de sa boîte TATA. Cette dernière est flanquée par des séquences palindromiques fortement conservées, montrées en bleu sur la figure 8 (Wilhelm et al. 2012).



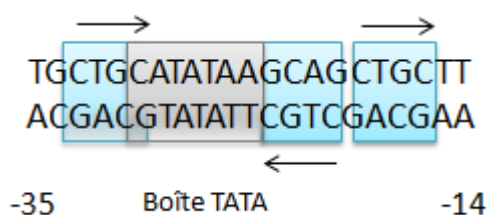
**Figure 8. Promoteur du VIH.** La partie du 5'LTR contenant les séquences liant les activateurs NFκB et NFAT et SP1 en amont de la séquence du promoteur central., TASHET (*Tata box and Adjacent Sequences of HIV Essential for Tat trans-activation*). (Modifié à partir de Wilhelm et al. 2013)

Dans une cellule infectée et activée, les activateurs de transcription des cellules immunitaires, comme le *Nuclear Factor kappa B* (NFκB) et le *Nuclear Factor of Activated T-cells* (NFAT) se retrouvent dans le noyau sous une forme active (Perkins et al., 1993; Karn et Soltzhus, 2012). De cette manière, ces activateurs peuvent stimuler le recrutement des facteurs de transcription canoniques comme le TBP, accompagné de ses TAFs, qui s'associent par la suite au promoteur et initient la transcription basale du VIH, dépendant de la pol II (Suñe et Garcia-Blanco, 1999). Un transcrit de pleine longueur est alors épissé par la machinerie d'épissage cellulaire et transloqué dans le cytoplasme pour produire les protéines précoces régulatrices Tat et Rev.

### 1.3.2.1 L'initiation

L'assemblage du complexe de pré-initiation contenant les facteurs de transcription cellulaires a lieu lors de l'association de TBP à la boîte TATA du promoteur central du HIV, tout comme dans la transcription générale cellulaire (Abrahams et al., 1994; Majello et al. 1998). Le motif de la boîte TATA est donc nécessaire à la transcription basale du VIH, et ceci même en absence de sa protéine trans-activatrice, Tat, puisque l'activité de la pol II en dépend (Berkhout et Jeang, 1992; Olsen et Rosen, 1992). En effet, lorsque la séquence du promoteur central du VIH est bloquée par des polyamides qui lient les régions flanquant immédiatement la boîte TATA, il est possible d'observer une inhibition de la transcription virale, même

en présence de la protéine Tat (Dickinson et al., 1998; ). En fait, directement en amont et en aval de la boîte TATA se trouvent des séquences palindromiques, nommées motifs CTGC (voir figure 9), qui sont hautement conservées et qui sont nécessaires à la trans-activation de la transcription du VIH par la protéine Tat. Lorsqu'elles sont mutées, même en présence d'une boîte TATA intacte, la transcription du provirus subit une diminution majeure (Wilhelm et al., 2012).

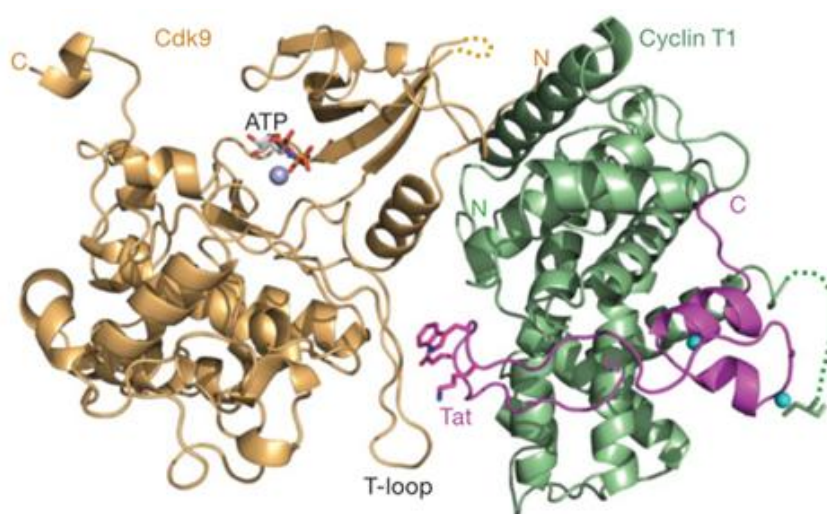


**Figure 9. Séquence d'ADN du promoteur central du VIH : TASHET.** La séquence du promoteur central du VIH contient une boîte TATA flanquée par des séquences de quatre nucléotides, CTGC, très conservées. Il y a un motif en 5' et deux autres en 3'. (Modifié à partir de Wilhelm et al., 2012)

### 1.3.2.2 L'élongation

La protéine virale Tat interagit avec plusieurs facteurs cellulaires de transcription, incluant TBP, des kinases et acétyl-transférases activatrices, tels que RSK2 et p300 respectivement, pour favoriser la transcription (Kashanchi et al. 1994; Hetzer et al. 2007; Wong et al. 2005). Une des fonctions très importantes de Tat est le recrutement du complexe cellulaire P-TEFb au niveau de l'ARN polymérase II (Garber et al., 1998). En fait, P-TEFb, impliqué dans l'élongation de la transcription, est séquestré par le complexe ribonucléo-protéique 7SK dans le noyau. Au sein de 7SK, P-TEFb est associé à la protéine inhibitrice HEXIM1 ainsi qu'à la structure secondaire en boucle de l'ARN non-codant 7SK, par l'intermédiaire de Cycline T1 (Ji et al. 2013). Quand il y a une quantité suffisante de Tat dans le noyau, cette protéine peut libérer P-TEFb en interagissant directement avec Cycline T1 au niveau de son

domaine cycline (Garber et al., 1998; Tahirov et al. 2010) et en délogeant HEXIM1 du complexe 7SK (Fraldi et al., 2005; D'Orso et Frankel, 2010) pour ainsi lever l'inhibition de PTEFb par HEXIM1. Cette interaction entre Tat et Cycline T1 permet à la protéine virale de recruter P-TEFb au niveau de l'ARN viral régulateur, TAR. En fait, l'ARN TAR contient une structure secondaire de tige-bourgeon-boucle qui va ancrer Tat au niveau du bourgeon et Cycline T1 sur sa boucle (Garber et al. 1998). Quand les deux protéines sont bien liées entre-elles et à l'ARN TAR, Tat peut activer Cycline T1, qui à son tour va activer CDK9, une kinase cycline dépendante. Cette dernière pourra donc hyperphosphoryler le CTD de la pol II et ainsi entamer l'élongation de la transcription du VIH (Kim et al. 2002).



**Figure 10. Structure cristalline du complexe P-TEFb et Tat.** La structure cristallisée des protéines Cycline T1 (vert) et CDK9 (orange pâle) qui compose le complexe de Positive Transcription Elongation Factor b. La protéine Cycline T1 interagit avec la protéine virale Tat (magenta) par l'intermédiaire des ions de zinc (boules bleues). (Tiré de Tahirov et al., 2010)

### 1.3.3 Le promoteur du VIH et l'axe de trans-activation Tat/TAR

La séquence d'ADN comprenant la boîte TATA ainsi que les motifs CTGC, qui sont essentiels pour la trans-activation du VIH par Tat (TASHET), est également nécessaire pour l'assemblage d'un complexe de pré-initiation spécifique au promoteur du VIH (Wilhelm et al., 2012). En fait, Wilhelm et al. montrent que les facteurs généraux de transcription retrouvés sur un promoteur canonique, dont le promoteur de l'adénovirus (AdMLP), forment des complexes différents de ceux retrouvés avec des facteurs reconnaissant spécifiquement TASHET. Ces facteurs cellulaires sont également absents sur un TASHET aberrant, ayant donc les motifs CTGC mutés. Basée sur leur sélectivité du promoteur du VIH, comparé aux promoteurs contrôles, ces facteurs cellulaires formeraient le complexe de pré-initiation du VIH (PICH). De plus, ces observations corrélaient avec celles de Suñé et García-Blanco, en 1992, démontrant que la trans-activation par Tat nécessite des co-activateurs qui ne sont pas des facteurs généraux de transcription.

#### 1.3.3.1 Identification des protéines de PICH

Pour valider notre hypothèse, nous avons procédé à l'identification de ces facteurs protéiques cellulaires. Tout d'abord, des extraits nucléaires de cellules HeLa ont été utilisés pour une chromatographie par affinité à l'ADN de TASHET, et les protéines nucléaires immobilisées ont été séparées par SDS-PAGE (Emmanuelle Wilhelm). Par la suite, les bandes apparaissant uniquement sur la piste de TASHET type sauvage ont été découpées et envoyées à être identifiées par spectrométrie de masse (Christie Hunter, AbSciex). Parmi les candidats obtenus, nous avons retenu trois protéines qui forment un complexe entre elles, observé par une co-immunoprécipitation réalisée par Emmanuelle Wilhelm. Ces protéines ont été nommées d'après leur présence dans le PICH ainsi que d'après leur poids moléculaire, ex. PICH-115. Mon projet de maîtrise est basé sur la protéine PICH-115.



### 1.3.3.1.1 PICH-115

La protéine nucléolaire PICH-115 est conservée à travers plusieurs organismes. De plus, PICH-115 a des activités enzymatiques d'ATPase, d'hélicase, ainsi que d'acétyl-transférase (Chimnaronk et al., 2009), qui soutiennent sa fonction d'acétyler l'ARN dans plusieurs des organismes étudiés (voir tableau 1). Bien que PICH-115 n'ait jamais été cristallisé, cette dernière publication montre que PICH-115, qui est l'homologue humain de leur protéine d'étude TmcA, contiendrait un domaine ATPase suivi d'un domaine hélicase et d'acétyl transférase (figure 11). Les premières études portées sur la protéine humaine PICH-115 proposaient qu'elle acétylait à la fois des protéines, dont la tubuline et des histones, ainsi que l'ARN, comme l'ARN de la télomérase humaine (hTR) (Shen et al., 2009; Lv et al., 2003). Depuis, des études plus poussées ont été capables de montrer que bien qu'elle puisse interagir et acétyler quelques protéines nucléaires, comme la p53 au résidu K120, PICH-115 est véritablement une protéine qui modifie, de préférence, l'ARN (Suzuki et al., 2014; Sharma et al., 2015; Liu et al., 2016). Cet aspect nous a intrigués puisque l'ARN TAR du VIH est un facteur indispensable à la transcription virale et compose l'axe de trans-activation avec la protéine Tat.



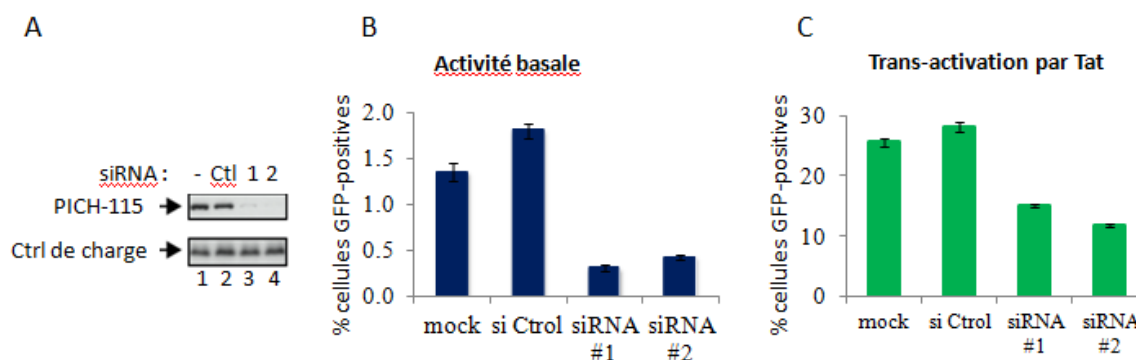
**Figure 11. Alignement des séquences consensus de TmcA et de ses homologues dans différents organismes.** La séquence numérotée de la protéine bactérienne de *Echireschia coli* est montré à la première rangée de la liste. Cette séquence est suivie, en ordre, de ses homologues retrouvées chez *Haemophilus influenzae*, *Vibrio vulnificus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Haloarcula marismortui*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, et *Homo sapiens*. (Tiré de Chimnaronk et al., 2009)

Tableau 1. Les homologues de PICH-115 dans divers organismes

Caractéristiques	Organismes			
	<u>E.coli K-12</u> <sup>1</sup>	<u>S.cerevisiae</u> <sup>2,3</sup>	<u>M.musculus</u> <sup>4</sup>	<u>H.sapiens</u> <sup>5,6,7</sup>
Homologues	TmcA	KRE33	NAT10	NAT10
Poids Moléculaire	75KDa	119KDa	115KDa	115KDa
Fonction(s)	Acétyle ARNt	Acétyle ARNr 18S et ARNt	Lie l'ARN	Acétyle ARNr 18S et ARNt Prot. nucléaires
Phénotype de délétion	Non-essentiel	Essentiel	Essentiel	Essentiel

Sources: 1- Chimnaronk et al., 2009; 2- Ito et al., 2014; 3- Sharma et al., 2015; 4- Skarnes et al., 2011; 5- Tan et al., 2013; 6- Wang et al., 2015; 7- Liu et al., 2016

En 2008, Brass et al., ont lancé un criblage de siRNA dans le but d'identifier des facteurs cellulaires nécessaires à l'infection par le VIH. Dans ce criblage qui a identifié plusieurs centaines de gènes, PICH-115 s'est retrouvé dans la liste des gènes essentiels à la réplication du virus dans sa cellule hôte. De plus, PICH-115 a été identifié dans l'interactome *in vitro* de la protéine virale Tat dans une expérience où une protéine de fusion GST-Tat est utilisée comme appât pour immobiliser les facteurs nucléaires des cellules HEK293 (cellules embryonnaires de foie) et Jurkat (lymphocytes) (Gauthier et al., 2009). Donc, à la fois Tat et TAR semblent être des candidats de substrats modifiés par PICH-115 lors de l'initiation de la transcription du VIH. Dans notre laboratoire, nous avons pu observer que la transcription du VIH diminue d'un facteur de 5.8 en absence de Tat (figure 12B) et avec un facteur de 2 en présence de Tat (figure 12C), dans des cellules traitées avec des siRNA contre le PICH-115 endogène (figure 12A, pistes 3 et 4). Ensemble, ces données nous ont encouragés à étudier PICH-115 comme un cofacteur potentiel de la protéine virale Tat dans la transcription du VIH.



**Figure 12. Effet de la déplétion de PICH-115 endogène sur l'activité du promoteur du VIH.** A) Western Blot montrant la déplétion de la protéine PICH-115 endogène suite au traitement avec les deux siRNA. Puits 1 : Contrôle négative de *knock down* avec un traitement simulé. Puits 2 : Contrôle négatif avec un siRNA contrôle de séquence aléatoire. Puits 3 : Déplétion de PICH-115 par traitement avec siRNA1 qui cible l'exon 2 de PICH-115. Puits 4 : Déplétion de PICH-115 par traitement avec siRNA2 ciblant le 5'-UTR de la protéine PICH-115. B) Mesure de l'activité basale de transcription du gène rapporteur GFP dirigé par le promoteur du VIH dans l'absence de Tat. C) Mesure de la trans-activation de la transcription du gène rapporteur GFP dirigé par le promoteur du VIH en présence de Tat. (Emmanuelle Wilhelm, résultats publiés.)

## **1.4 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE**

**Le facteur cellulaire, PICH-115, crée le lien entre le TASHET et l'axe de trans-activation de la transcription du VIH, en agissant comme un cofacteur de la protéine virale Tat.**

### **Objectifs**

- I. Déterminer si les protéines PICH-115 et Tat interagissent de manière directe, en absence de l'ARN, en utilisant des protéines recombinantes purifiées.**
- II. Évaluer l'effet de PICH-115 sur l'interaction entre la protéine virale Tat et son partenaire de trans-activation, l'ARN TAR du VIH.**

## Les objectifs

### 2.1 OBJECTIF I

**Déterminer si les protéines PICH-115 et Tat interagissent de manière directe, en absence de l'ARN, en utilisant des protéines recombinantes purifiées.**

La protéine PICH-115 est conservée à travers divers organismes (voir tableau 1), et est connue pour interagir avec, et même acétyler, l'ARN. Cette protéine peut également interagir de façon directe avec des protéines cellulaires impliquées dans la régulation des ARN, dont AGO1 du complexe RISC et MEX3C, une ubiquitine ligase E3 qui lie l'ARN (Höck et al., 2007; Cano et al., 2012). De plus, PICH-115 est retrouvée dans l'interactome de la protéine Tat qui compose l'axe de trans-activation de la transcription du VIH, avec l'ARN TAR (Gautier et al., 2009). Donc, étudier l'interaction directe de ces deux protéines, dans le contexte de la transcription virale, nous a semblé nécessaire. Pour déterminer si l'interaction physique entre ces deux protéines est directe, nous avons purifié des protéines recombinantes produites dans des bactéries *E.coli BL21DE3*. Par la suite, il a été possible de déterminer la présence d'une liaison entre Tat et PICH-115, et de cartographier les domaines d'interaction de Tat avec PICH-115, par GST-Pull down en présence d'ARNase.

#### 2.1.1 MATÉRIEL ET MÉTHODES

##### 2.1.1.1 Souches de bactéries utilisées

La souche *E.coli DH5α* a été utilisée pour l'amplification des plasmides contenant les protéines d'intérêt. Une deuxième souche, *E.coli BL21DE3*, a été employée pour la production des protéines recombinantes. Le choix de cette souche est dû au fait qu'elle ne contient pas de recombinaison.

### 2.1.1.2 Clonage des plasmides

La séquence d'ADN de Flag-PICH115-8His a été générée à partir du plasmide pCMVSPORT6, contenant PICH115 sans étiquette, avec la technique de PCR décrite par Ailenberg et al. 1996 (Liste d'amorces utilisées dans le tableau 1). Les sites de restriction NcoI et BamHI ont été ajoutés en 5' et le site EcoRI en 3'. Le fragment d'intérêt est purifié par extraction de gel en suivant le protocole de BioBasic et inséré dans les sites NcoI et EcoRI du plasmide pET28a (EMD Biosciences) linéaire par ligation à 16°C pendant la nuit.

Le plasmide pGEX2TK-GST-Tat86R (AIDS Reagent) est amplifié dans les bactéries *DH5α* et est utilisé pour l'expression de la protéine recombinante type sauvage de Tat dans les bactéries *E.coli BL21DE3*. Des plasmides similaires contenant des versions tronquées de la protéine GST-Tat sont également obtenus d'AIDS Reagent ( $\Delta 2/36$ ,  $\Delta 48$ ,  $\Delta 72$  et C22G). Les mutations ponctuelles et troncations additionnelles de la protéine Tat ont été produites dans ces pGEX2TK-GST-Tat86R par mutagenèse dirigée par PCR *around the world* en utilisant les amorces retrouvées dans le tableau 3. Les séquences ont été vérifiées par séquençage (Plateforme de Séquençage ULaval).



**Tableau 3. Liste des amorces utilisées pour les clonages de GST-Tat**

Amorces	Séquences
TatD37/47_F	5'-CTTTCATTGCCAAGTTGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAG-3'
TatD37/47_R	5'-CCGCTTCTTCCTGCCAACTTGGCAATGAAAGCAACACTTTTACAATAGC-3'
TatD57_F	5'-GGAGACAGCGACGAAGATAGC CTCAAG-3'
TatD57_R	5'-GTC TGA CTGCCTTGAGGCTATCTTCG-3'
TatQ35L_F	5'-AGTGTTGCTTTCATTGCCTAGTTTGTTTC-3'
TatQ35L_R	5'-TAGGCAATGAAAGCAACACTTTTACAATAGC-3'
TatF38A_F	5'-TGCCAAGTTTGTGCCATAACAAAAGCCTTAGGC-3'
TatF38A_R	5'-GGCTTTTGTATGGCACAAACTTGGCAATGAAAGC-3'
TatI39Q_F	5'-GCCAAGTTTGTTCCTTCCAAACAAAAGCCTTAGGCATC-3'
TatI39Q_R	5'-CCTAAGGCTTTTGTTCCTTGGAAACAAACTTGGCAATGAAAGC-3'
TatK41A_F	5'-GTTTCATAACAGCAGCCTTAGGCATCTCCTATGGC-3'
TatK41A_R	5'-GATGCCTAAGGCTGCTGTTATGAAACAAACTTGGC-3'
TatL43A-G44A_F	5'-AGCCGCAGCCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCG-3'
TatL43A-G44A_R	5'-TAGGAGATGGCTGCGGCTTTTGTATGAAACAAACTTGGC-3'
TatS46P_F	5'-TAGGCATCCCATATGGCAGGAAGAAGCGGAG-3'
TatS46P_R	5'-CCTGCCATATGGGATGCCTAAGGCTTTTGTATGAAACAAAC-3'

### 2.1.1.3 Production des protéines recombinantes

#### 2.1.1.3.1 Flag-PICH115-8His

Les bactéries *E.coli* BL21-DE3 chimio-compétentes (PEG-DMSO) ont été transformées avec les plasmides pET28a contenant la séquence codante pour Flag-PICH115-8His en aval du promoteur inductible T7-lacO. Ces bactéries sont étalées sur pétri LB agar (EMD) + kanamycine et laissées à 37°C pendant la nuit. Une pré-culture de 5ml de milieu LB (EMD) en présence de kanamycine (0.05mg/ml) est inoculée avec une colonie de bactéries transformées à 37°C pendant la nuit. Le lendemain, la pré-culture est diluée 1/100 dans 500ml de milieu LB + kanamycine et les bactéries



sont laissées pousser jusqu'à la phase exponentielle (DO<sub>600nm</sub> entre 0.4 et 0.6) à 37°C. À cette densité optique, la croissance bactérienne est arrêtée dans un bain d'eau glacée pendant 30 minutes et ensuite la production de la protéine recombinante PICH-115 a été induite avec 0.1mM d'IPTG (BioShop) à 15°C pendant 8 heures. L'induction est arrêtée en sortant simplement la culture de l'incubateur et en la centrifugeant à 6000g/10min/4°C. Le culot est subitement congelé à -20°C.

#### **2.1.1.3.2 GST-Tat et mutants**

Les bactéries *E.coli* BL21-DE3 chimio-compétentes (PEG-DMSO) ont été transformées avec les plasmides pGEX-2TK contenant la séquence codante pour GST-Tat type sauvage, et les mutants, en aval du promoteur inductible lac. Ces bactéries sont étalées sur pétri LB agar (EMD) + ampicilline et laissées à 37°C pendant la nuit. Une pré-culture de 20ml de milieu LB (EMD) en présence d'ampicilline (0.1mg/ml) est inoculée avec une colonie de bactéries transformées à 37°C pendant la nuit. Le lendemain, la pré-culture est diluée 1/25 dans 500ml de milieu LB + ampicilline (0.1mg/ml) et les bactéries sont laissées croître jusqu'à la phase exponentielle (DO<sub>600nm</sub> entre 0.4 et 0.6) à 37°C. À cette densité optique, l'expression de la protéine recombinante GST-Tat est induite avec 0.1mM d'IPTG à 37°C pendant 1h30. L'induction est arrêtée, la culture est centrifugée à 6000g/10min/4°C et le culot est congelé à -20°C.

#### **2.1.1.4 Tests d'induction**

Lors de l'induction, des aliquots de cultures de 10ml de bactéries, l'une induite et l'autre non-induite pour chaque protéine d'intérêt, sont incubées séparément. Elles subissent les mêmes traitements de croissance que les cultures de 500ml. Après l'induction, ces cultures tests sont centrifugées 6000g/10min/4°C et les surnageants sont retirés. Les culots sont, par la suite, resuspendus avec 1ml d'eau nano et 100µl de

cette solution est soniquée 3 fois 2min30sec avec le programme ON30s/OFF10s/100A. Les échantillons de 100µl sont centrifugés à 13000rpm/15min/4°C et les surnageants contenant les protéines solubles sont transférés dans de nouveaux tubes et les culots, fractions de protéines insolubles, sont repris dans 100µl d'eau nano. 10µl de chaque échantillon, soluble et insoluble, sont transférés dans de nouveaux tubes et 3µl de tampon Laemmli Bleu 4X y sont ajoutés. Ces échantillons sont ensuite bouillis à 105°C pendant 5 minutes et les protéines sont séparées par SDS-PAGE 10% et colorées par Bleu de Coomassie.

#### **2.1.1.5 Purification des protéines recombinantes**

##### **2.1.1.5.1 Flag-PICH115-8His**

Le culot de 500ml de culture bactérienne induite est partiellement dégelé sur glace et ensuite resuspendu dans 5ml de tampon de lyse (20mM HEPES-KOH pH 7.9, 20% Glycérol, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP40, 1M KCl, 5mM Imidazole (BioShop), 7mM β-mercaptoEthanol (Sigma), 0.5mM PMSF, 1 pastille cOmplete Mini EDTA-free/10ml de tampon (Roche)). Les bactéries homogénéisées sont transférées dans un tube en verre, lysées par sonication (sonde Tisumizer à 70% de fréquence) deux fois pendant 5 minutes (le lysat est homogénéisé par inversion entre deux sonications) et centrifugées à 13000rpm/10min. Le surnageant est gardé sur glace dans un nouveau tube 15ml et le culot est resuspendu dans 5ml du tampon de lyse et re-soniqué et centrifugé comme la première fois. Les surnageants (2) sont ensuite regroupés ensemble et centrifugés à 21000rpm/30minutes. Le nouveau surnageant, dans lequel se retrouvent les protéines solubles, est séparé par filtre (0.2µm de Millex-GP) et ensuite verser sur 500µl de résine de Ni-NTA Agarose (Qiagen) équilibrée avec tampon B5/1 (20mM HEPES-KOH pH7.9, 20% Glycérol, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP40, 1M KCl, 5mM Imidazole, 7mM β-mercaptoEthanol) et laissé à interagir à 4°C/2h30 dans un tube Falcon de 50ml pour favoriser la liaison des protéines Flag-PICH115-8His à la résine. Toujours à 4°C, l'extrait protéique, avec la résine, est

transféré sur une colonne de purification par gravité His-TRAP (Qiagen). Après le passage de l'extrait, la résine est lavée en série par les tampons de lavage inscrits en ordre dans le tableau 4. Vu que la protéine PICH-115 avait la tendance à s'agréger, il fallait utiliser plusieurs tampons de lavages successivement pour assurer que la protéine soit soluble et que la préparation soit pure. L'élution de la protéine Flag-PICH115-8His se fait avec le tampon d'élution E250/0.3 (20mM HEPES-KOH pH 7.9, 20% Glycérol, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP40, 300mM KCl, 250mM Imidazole, 7mM  $\beta$ -mercaptoEthanol) en 10 fractions de 250 $\mu$ l déposés directement sur la résine et recueillis dans des tubes 1.5ml.

**Tableau 4: Tampons de lavage utilisés pour la purification de Flag-PICH115-8His**

Composition	Tampons de Lavage				
	L20/1	L40/1	L40/0.8	L60/0.6	L60/0.4
HEPES-KOH pH7.9	20 Mm	20 Mm	20 Mm	20 Mm	20 Mm
Glycérol	20%	20%	20%	20%	20%
KCl	1M	1M	0.8M	0.6M	0.4M
MgCl <sub>2</sub>	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM
Imidazole	20mM	40mM	40mM	60mM	60mM
NP40	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%	0.10%
$\beta$ -MercaptoEtOH	7mM	7mM	7mM	7mM	7mM

#### 2.1.1.5.2 Dialyse en étapes

Les protéines dans les fractions d'élution sont séparées par SDS-PAGE 10% et colorées par Bleu de Coomassie pour visualiser la pureté des éluats. Les fractions les plus propres et contenant le plus de protéine d'intérêt de pleine longueur sont regroupées ensemble dans une membrane de dialyse (Cut-Off 10KDa). La dialyse de la

protéine recombinante Flag-PICH115-8His est faite en étapes dans un volume de tampon d'au moins 100X le volume de fraction total dans la membrane. Les tampons de dialyse sont retrouvés, en ordre, dans le tableau 5. La membrane de dialyse contenant la protéine est plongée dans les deux premiers tampons de dialyse, sous agitation, à 4°C, pendant une heure. Le troisième tampon est utilisé pendant la nuit à 4°C et la dernière dialyse avec le tampon G20/I0 dure 4 heures à 4°C. Le dialysat est transféré dans un tube 1.5ml et centrifugé 13000rpm/15min/4°C. Le surnageant est transféré en entier dans un nouveau tube 1.5ml siliconé (Sigma) pour que la préparation soit homogène avant sa distribution. La protéine est aliquotée en plus petits échantillons de 50-100µl, toujours dans les tubes siliconés. Un 10µl du surnageant et le culot sont gardés de côté pour déposer sur SDS-PAGE. Les aliquots de protéines sont rapidement congelés dans l'azote liquide avant d'être gardés à -80°C.

**Tableau 5: Tampons de Dialyse en étape de Flag-PICH115-8His**

Composition	Tampons de Dialyse			
	G20/I125	G20/I75	G20/I25	G20/I0
<b>HePes-KOH pH7.9</b>	20mM	20mM	20mM	20mM
<b>Glycérol</b>	20%	20%	20%	20%
<b>KCl</b>	300mM	300mM	300mM	300mM
<b>MgCl2</b>	10mM	10mM	10mM	10mM
<b>Imidazole</b>	125mM	75mM	25mM	0mM
<b>NP40</b>	0.20%	0.20%	0.20%	0.20%
<b>β-MercaptoEtOH</b>	7mM	7mM	7mM	7mM

### 2.1.1.5.3 GST-Tat et mutants

Le culot de 500ml de culture bactérienne induite est partiellement dégelé sur glace et ensuite resuspendu dans 5ml de tampon de lyse (50mM Tris-HCl pH 8.0, 120mM NaCl, 0.5% NP40, 5mM DTT (Laboratoire MAT), 0.5mM PMSF, 1 pastille cOmplete Mini EDTA-free/10ml de tampon (Roche)). Les bactéries homogénéisées sont transférées dans un tube en verre, lysées par sonication (sonde Tissumizer à 70% de fréquence) deux fois pendant 5 minutes (lysate est homogénéisé par inversion entre deux sonications) et centrifugées à 13000rpm/10min. Le surnageant est gardé sur glace et le culot est resuspendu dans 5ml du tampon de lyse et re-soniqué et centrifugé. Les surnageants (2) sont ensuite regroupés ensemble et centrifugés à 21000rpm/30minutes. Ce surnageant, dans lequel se retrouve les protéines, est filtré (0.2µm de Millex-GP) sur 500µl de résine de Sépharose-Glutathione (GE Healthcare) équilibrée avec le tampon EBC+ (50mM Tris-HCl pH 8.0, 120mM NaCl, 0.5% NP40, 5mM DTT) et laissé à interagir à 4°C pendant la nuit dans un tube Falcon de 15ml pour favoriser la liaison entre les protéines recombinantes GST-Tat et les billes glutathione-sépharose. Toujours à 4°C, l'extrait protéique, avec la résine, est transféré sur une colonne de purification par gravité Hi-TRAP (Qiagen). Après le passage de l'extrait bactérien, la résine est lavée une première fois avec 10ml de tampon EBC+ et une deuxième fois avec le tampon EBC- (50mM Tris-HCl pH 8.0, 120mM NaCl, 5mM DTT). L'élution des protéines GST-Tat et mutants se fait avec un tampon d'élution EBC-/Glut (50mM Tris-HCl pH 8.0, 120mM NaCl, 10mM Glutathione réduite (BioShop), 5mM DTT) en 6 fractions de 250µl déposés directement sur la résine et recueillis dans des tubes 1.5ml. La colonne est bouchée pendant 1 minute pour concentrer les protéines dans les fractions 3-5.

#### 2.1.1.5.4 Dialyse

Comme pour la protéine Flag-PICH115-8His, les fractions contenant le plus de protéines GST-Tat de pleine longueur sont regroupées et transférées dans une membrane de dialyse (Cut-Off 10KDa). Cette membrane est ensuite déposée dans le tampon de dialyse (20mM HEPES-KOH pH7.9, 20% Glycérol, 100mM KCl, 0.2mM EDTA, 5mM DTT) à un volume d'au moins 100X le volume du contenu de la membrane. Le tampon de dialyse est renouvelé deux fois à un intervalle d'une heure. Le dialysat est transféré dans un tube 1.5ml et centrifugé 13000rpm/15min/4°C. Le surnageant est transféré en entier dans un nouveau tube 1.5ml siliconé (Sigma) et ensuite la protéine est aliquotée en plus petits échantillons de 50-100µl, toujours dans les tubes en silicone. Un 10µl du surnageant et le culot sont gardés de côté pour déposer sur SDS-PAGE. Les aliquots de protéines sont entreposés de la même manière que les protéines Flag-PICH115-8His.

#### 2.1.1.6 *Interaction entre protéines recombinantes par GST-Pulldown*

Cette interaction protéine-protéine est faite sur 20µl de résine de billes de Sépharose-Glutathione (GE Healthcare) équilibrée avec le tampon EBC+ (voir Purification de GST-Tat). 40pmol de GST-Tat86R ou mutants ou contrôles sont déposés sur les billes et le volume est complété à 200µl avec le tampon EBC+. Ces échantillons sont laissés sur agitateur à 4°C pendant 30 minutes pour que les protéines se lient aux billes. Par la suite, ces tubes sont centrifugés à 2000rpm/2min et les surnageants contenant les protéines Tat n'ayant pas été immobilisées par les billes Glutathione sont retirés. Les billes sont par la suite lavées avec 500µl du tampon G0/K150 (20mM HEPES-KOH pH7.9, 150mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP40, 7mM β-mercaptoEthanol) pour rendre le milieu de réaction favorable pour la protéine PICH-115. La résine est reprise dans 80µl de ce même tampon auquel se rajoute séquentiellement le tampon G20/K150 (20mM HEPES-KOH pH7.9, 20% glycérol, 150mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP40, 7mM β-mercaptoEthanol) et 40pmol de

Flag-PICH115-8His. Le volume total de l'interaction est de 200 $\mu$ l. Entre l'addition de chaque composant de la réaction, il est nécessaire de mélanger le volume de réaction pour que les composants des tampons puissent bien se distribuer dans la solution finale. L'interaction protéique se fait à température ambiante pendant une heure sur un agitateur rotatif. Les échantillons sont par la suite centrifugés à 2000rpm/2min/Tp et les surnageants sont récoltés dans de nouveaux tubes 1.5ml : serviront de contrôles techniques. La résine est lavée trois fois avec 900 $\mu$ l du tampon G10/K800 (20mM HEPES-KOH pH7.9, 10% glycérol, 800mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP40, 7mM  $\beta$ -mercaptoEthanol) pour assurer que les protéines restantes sur les billes ne soient que celles qui s'y attachent par interaction spécifique entre l'étiquette GST et la glutathione. La résine est ensuite lavée deux autres fois avec 900 $\mu$ l du tampon G10/K100 (20mM HEPES-KOH pH7.9, 10% glycérol, 100mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP40, 7mM  $\beta$ -mercaptoEthanol) pour diminuer la concentration de sel dans la réaction à 100mM de KCl ce qui garde les protéines solubles et les rends plus faciles à charger sur gel SDS-PAGE. Les billes retenant les protéines sont reprises dans 1X son volume avec le tampon G10/K100, dans lequel 15 $\mu$ l de tampon Laemmli Bleu 4X est ajouté. Les échantillons sont ensuite bouillis à 105°C/5min pour éluer les protéines et centrifugés à 2000rpm/6min. Les surnageants contenant maintenant les protéines sont transférés dans de nouveaux tubes 1.5ml à l'aide d'embouts à pointes effilées pour minimiser le transfert de billes. Ces échantillons de protéines, ainsi que les contrôles de Flag-PICH115-8His non-liés, sont par la suite séparés par SDS-PAGE 10%, transférés sur membrane de nitrocellulose dans un tampon de transfert à 20% d'éthanol à 100V/2h/4°C. Les anticorps  $\alpha$ -PICH115 (Santa Cruz : sc-271770) et  $\alpha$ -GST (Santa-Cruz : sc-138) sont utilisés pour détecter les protéines PICH-115 et GST-Tat, respectivement.

#### ***2.1.1.7 Quantification et normalisation des interactions protéine-protéine***

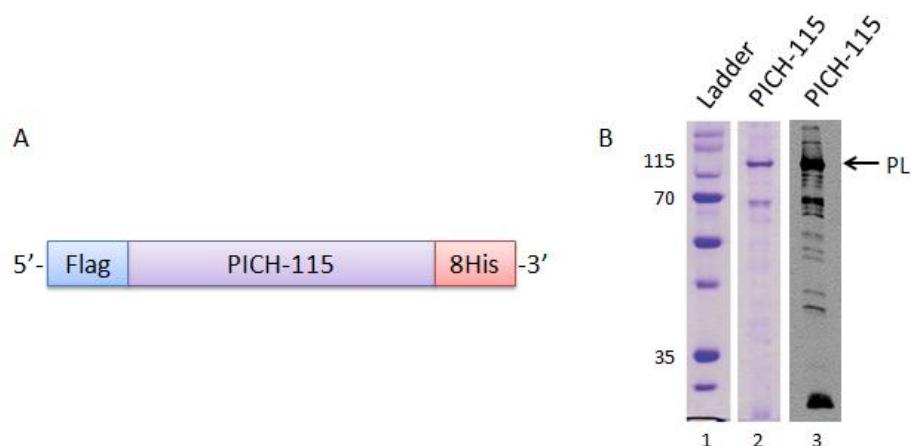
Les signaux de protéines obtenus par Western Blot de deux à trois expériences de GST-Pulldown sont quantifiés par le logiciel ImageJ et transformés en valeurs numériques. Ces données-ci sont transférées sur Excel (Microsoft) dans le but de pouvoir représenter les ratios d'interaction par graphiques. Les ratios d'interaction ont été obtenus en divisant les valeurs numériques des signaux de PICH-115 par ceux de GST-Tat. Les ratios ont été par la suite normalisés à celui correspondant à l'interaction entre PICH-115 et Tat TS qui représente un ratio = 1. La moyenne des ratios obtenus de trois expériences différentes est montrée sur graphique avec les écarts types.



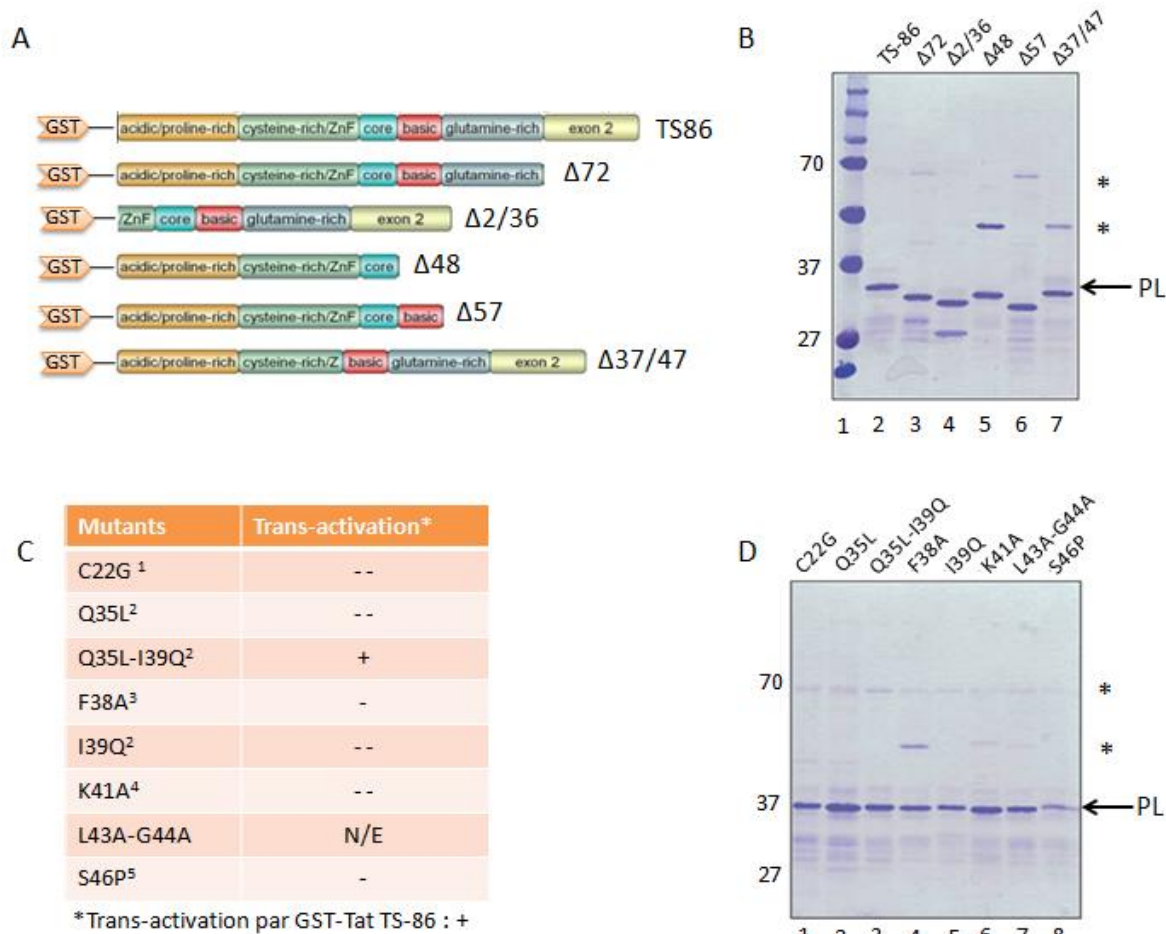
## 2.1.2 RÉSULTATS

### 2.1.2.1 Purification des protéines recombinantes

Pour étudier l'interaction directe entre les protéines PICH-115 et GST-Tat, nous avons purifié des protéines recombinantes étiquetées à partir des bactéries *E.coli* BL21DE3. Les difficultés majeures auxquelles nous avons fait face étaient l'induction et la purification de la protéine PICH-115. La protéine de 115kDa était très peu ou pas exprimée dans les bactéries pendant les essais d'induction. Si elle était produite, la protéine était complètement dans la fraction insoluble. Nous avons alors dû optimiser les conditions d'induction à l'IPTG à 9heures à 16°C. Cette baisse de température nous a permise de maintenir la solubilité de la protéine PICH-115 puisqu'elle évitait la formation des corps d'inclusion dans les bactéries lors de l'induction de l'expression des protéines recombinantes de grandes tailles. Ensuite, la purification a été faite dans la chambre froide, à 4°C, en étape pour assurer que PICH-115 ne s'agrège pas sur les billes agarose Ni-NTA. PICH-115 est gardée soluble en la dialysant contre des tampons avec une diminution graduelle de imidazole à 4°C. La protéine finale obtenue peut être visualisée sur la figure 13B, piste 2 et 3.



**Figure 13. PICH-115 purifié.** A. Schéma de la protéine recombinante PICH-115 purifiée et étiquetée en 5' avec Flag et en 3' avec 8 histidines. B. La protéine purifiée migrée sur SDS-PAGE. Sur la piste 1, marqueur de poids moléculaire, la fraction soluble est coloré au bleu de coomassie sur la piste 2 et révélée avec un anti-PICH115 par immunobuvardage de type Western.



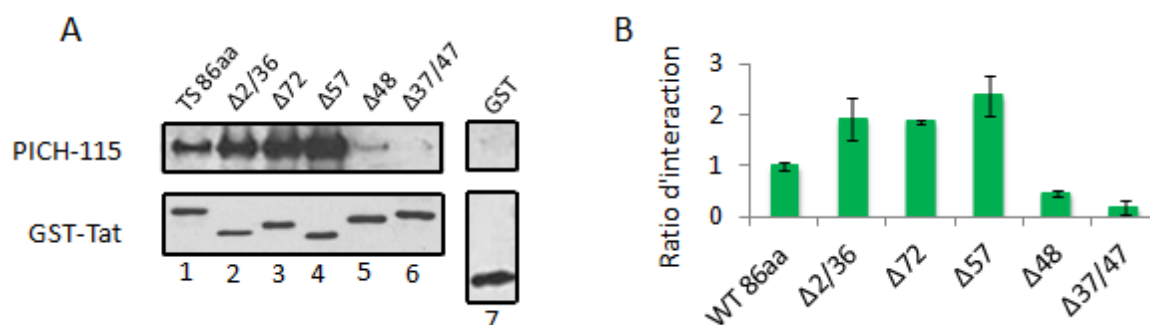
**Figure 14. GST-Tat purifié.** A. Schémas des GST-Tat mutants purifiées et tronquées à partir de la protéine pleine longueur montrant les domaines enlevés avec les délétions. Schéma de la protéine type sauvage TS avec ses 86 acides aminés est présenté à la première rangée. Les délétions successives,  $\Delta 72$ ,  $\Delta 2/36$ ,  $\Delta 48$ ,  $\Delta 57$  et  $\Delta 37/47$  sont représentés dans les rangées suivant le schéma TS. B. SDS-PAGE des protéines GST-Tat type sauvage (TS) et les mutants tronqués purifiés et solubles, colorées par bleu de Coomassie. C. Tableau des mutations ponctuelles introduites dans GST-Tat à partir de la littérature et leur effet sur la fonction trans-activatrice de GST-Tat comparé au type sauvage. D. SDS-PAGE des protéines avec les mutations ponctuelles purifiées et solubles, colorées par bleu de Coomassie. Les versions des protéines pleine longueur sont indiquées par une flèche (PL). Les astérisques (\*) représentent des bandes non-spécifiques obtenues lors de la purification. Références : 1- Garber et al., 1998; 2- Dey et al., 2012; 3- Ronsard et al., 2014; 4- Desfosses et al., 2005; 5- Meyerhans et al., 1989.

### 2.1.2.2 *Tat nécessite les domaines central et basique pour interagir avec PICH-115*

Dans le but de caractériser les domaines d'interaction de Tat avec PICH-115, nous avons produit des protéines Tat tronquées, comme montré sur la figure 14A. Les protéines ont été purifiées sur colonne de résine de Sépharose-Glutathione. Nous voulions tester l'interaction entre les versions clivées de Tat déjà utilisées dans la littérature, dont  $\Delta 72$ ,  $\Delta 48$ ,  $\Delta 2/36$  qui ont été purifiées à partir des plasmides reçus d'AIDS Reagent. Pour pouvoir mieux étudier l'effet qu'a chaque domaine de Tat sur sa liaison à PICH-115, nous avons produit et purifié des délétions supplémentaires,  $\Delta 57$  qui enlève l'exon 2 et le domaine riche en glutamine de Tat et  $\Delta 37/47$  qui enlève le domaine central (figure 14B, pistes 6 et 7 respectivement).

Nous avons été capables de démontrer que la protéine PICH-115 peut interagir d'une manière directe, et spécifique, avec la protéine GST-Tat TS *in vitro*, dans l'absence d'ARN (figure 15A, piste 1). En effet, le contrôle négatif, la protéine GST, est incapable de lier PICH-115, montrant que l'interaction se fait avec Tat et non l'étiquette GST (figure 15A piste 7). De plus, quand on enlève le domaine N-terminal ( $\Delta 2/36$ ), PICH-115 lie presque deux fois mieux à Tat comparé au type sauvage, comme montré sur la figure 15A, piste 2. Cette augmentation de liaison est également observée lorsqu'on enlève l'exon 2 de Tat, avec la délétion  $\Delta 72$  (piste 2 et 3, respectivement). L'interaction entre PICH-115 et Tat est la plus forte, proche de 2.4 fois plus, lorsqu'on utilise le mutant  $\Delta 57$ , dans le puits 4, qui ne contient que les domaines central et basique en C-terminal. Toutefois, on observe une diminution considérable de 50% de liaison lorsqu'on retire le domaine basique du C-terminal., ce qui est le cas avec le mutant  $\Delta 48$ , montrant que le domaine basique est important pour une forte liaison (figure 15B colonne 5). La mutation  $\Delta 48$ , par contre, ne contient que les domaines N-terminal et le domaine central. En effet, PICH-115 a pu se lier, plus ou moins, à toutes les délétions essayées, ce qui suggérait que même si le domaine basique était important pour une interaction protéique, le domaine central était le site de liaison majeur pour notre PICH-115. Cette hypothèse fut confirmée quand la délétion

$\Delta 37/47$ , la suppression du domaine central, liait PICH-115 autant que le contrôle négatif GST seul (figure 15A piste 6-7).

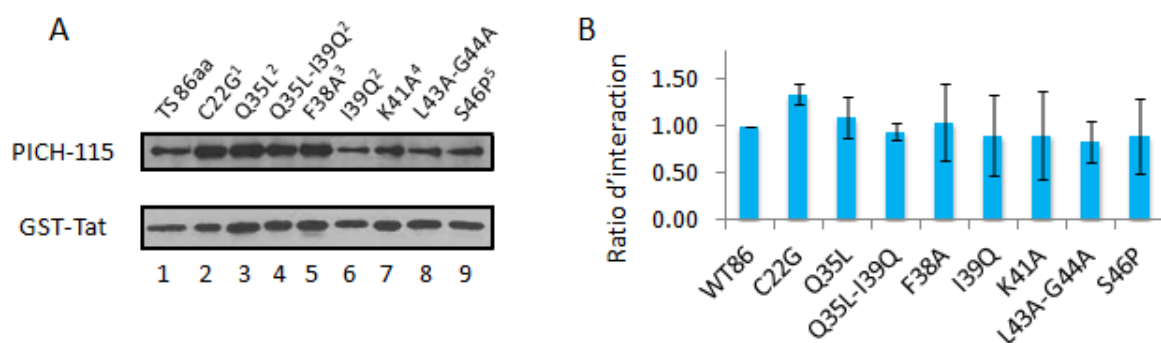


**Figure 15. GST-Pulldown des protéines Tat tronquées.** Les versions tronquées de la protéines GST-Tat sont en interaction avec PICH-115 de type sauvage. A) Immunobuvardage de type Western du GST-Pulldown. Les échantillons retrouvés dans les puits : 1- GST-Tat TS, 2- GST-Tat tronquée en N-terminal ( $\Delta 2/36$ ), 3- GST-Tat sans l'exon 2 ( $\Delta 72$ ), 4- GST-Tat tronquée à partir du domaine basique ( $\Delta 57$ ), 5- GST-Tat tronquée au C-terminal ( $\Delta 48$ ), 6- GST-Tat dépourvu de son domaine central ( $\Delta 37/47$ ), 7- contrôle négatif d'interaction, l'étiquette GST seule sur les billes Gluthatione immobilisées. B) Représentation graphique du ratio de liaison entre GST-Tat et PICH-115 de 2 expériences différentes, normalisé au ratio où l'interaction entre Tat TS et PICH-115 TS = 1.

### 2.1.2.3 Les mutations ponctuelles choisies dans Tat n'affectent pas son interaction avec PICH-115

Plusieurs résidus impliqués dans la régulation des protéines cellulaires lors de la transcription virale sont situés dans les domaines d'activation et central de la protéine Tat, donc ces deux domaines sont de très grande importance pour Tat. Ces régions de Tat sont aussi celles impliquées dans l'interactions entre Tat et Cycline T1. Donc, pour évaluer si ces résidus, qui étaient essentiels à la fonction trans-activatrice de Tat, étaient également nécessaires pour son interaction avec PICH-115, nous avons produit plusieurs mutations ponctuelles dans le domaine central (figure 14C). Ces mutations

ponctuelles ont été choisies puisqu'elles ont un effet sur l'interaction entre Tat et Cycline T1 ainsi que sur l'activation de Cycline T1 par Tat, et subséquemment sur la trans-activation de la transcription virale. Les mutations aux résidus C22, Q35, K41 de la protéine Tat vont inhiber sa capacité à se lier au complexe P-TEFb par le biais de Cycline T1 (Garber et al., 1998; Dey et al., 2012). Par contre, une mutation ponctuelle qui remplace l'isoleucine à la position 39 de Tat avec une glutamine va lui enlever sa fonction d'activer la Cycline T1, même si les deux protéines peuvent toujours interagir l'une avec l'autre (Dey et al., 2012). Dans le contexte d'interaction avec notre protéine d'intérêt, PICH-115, les mutants fonctionnels de Tat ne semblent pas inhiber la liaison protéique. En fait, d'après les résultats *in vitro* il semble que les protéines Tat mutées peuvent lier PICH-115 tout aussi bien que le type sauvage de la protéine virale (figure 16A). La seule mutation qui pourrait avoir un effet sur l'interaction entre PICH-115 et Tat est celle produite à la position 22 de Tat (figure 16A piste 2, 16B colonne 2). Curieusement, cette mutation ponctuelle semble légèrement augmenter le signal d'interaction, soit de 1.3 fois, alors qu'elle est connue pour inhiber l'interaction entre Tat et Cycline T1.



**Figure 16. GST-Pulldown des mutants Tat avec PICH-115 TS.** A. Western Blot de l'interaction entre PICH-115 TS et les mutants de GST-Tat par GST-Pulldown d'une expérience. B. Représentation graphique des ratios d'interaction entre les protéines GST-Tat et la protéine d'intérêt PICH-115 de 3 expériences différentes. Les ratios des mutants ont été normalisés au ratio obtenu par l'interaction entre GST-Tat TS et PICH-115 TS = 1. Références : 1- Garber et al., 1998; 2- Dey et al., 2012; 3- Ronsard et al., 2014; 4- Kashanchi et al., 1994; 5- Meyerhans et al., 1989.

## 2.2 OBJECTIF II

**Évaluer l'effet de PICH-115 sur l'interaction entre la protéine virale Tat et son partenaire de trans-activation, l'ARN TAR du VIH.**

L'ARN naissant lors de la transcription du VIH, TAR, est nécessaire à la formation de la boucle de trans-activation, puisqu'il lie directement la protéine trans-activatrice, Tat, au niveau de sa structure secondaire en bourgeon. En observant l'interaction directe entre les protéines PICH-115 et Tat, nous voulions déterminer si la protéine PICH-115 faisait partie du complexe Tat/TAR et quels seraient ses effets sur la formation de ce complexe. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode de migration par retardement sur gel acrylamide natif des complexes nucléoprotéiques (EMSA TAR).

### 2.2.1 MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 2.2.1.1 EMSA TAR

Pour cette expérience, une sonde de l'ARN TAR contenant un fluorophore Cy3 en 5' : 5'-/5Cy3/rGrGrG rUrCrU rCrUrC rUrGrG rUrUrA rGrArC rCrArG rArUrC rUrGrA rGrCrC rUrGrG rGrArG rCrUrC rUrCrU rGrCrC rUrArA rCrUrA rGrGrG rArArC rCrC-3' (IDT) est utilisée avec les protéines recombinantes d'intérêt, PICH115 et Tat. L'interaction se fait dans un volume de 20µl de tampon qui favorise la formation de complexes nucléo-protéiques (20mM HEPES-KOH pH7.9, 125mM KCl, 10% Glycérol, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.04% NP40, 1mM DTT, 0.2mM EDTA, 0.5U RNase Out (Catherine Desrosiers d'après Klink et al., 2001), 0.05mM pI:C (Sigma), 2.5pmol TAR RNA, 25pmol PICH115, 25pmol GST-Tat ou protéine contrôle). Les concentrations des constituants du tampon de réaction peuvent varier selon la préparation de protéines d'intérêt utilisée. Puisque les volumes de protéine à ajouter dépendent de la concentration de la préparation et qu'ils constituent une portion

considérable du volume de réaction, soit de 10-35%, leurs apports en sels, glycérol et détergent vont faire varier légèrement les concentrations d'un échantillon à l'autre. Dans des tubes de 1.5ml se retrouvent le tampon de réaction sans ARN TAR sur lequel sont rajoutées les protéines d'intérêt. Après avoir homogénéisé la réaction par tapotement, les tubes sont placés sur glace pendant 5 minutes. L'ARN TAR est rajouté tube par tube à la fin des 5 minutes et mélangé par tapotement. Les interactions se font pendant 30 minutes à température ambiante dans la noirceur. Une fois ce temps écoulé, les échantillons sont chargés délicatement sur un gel acrylamide natif (2X Tris-Glycine, 4.5% acrylamide : bisacryl (30 : 0.8), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 3% glycérol, 1mM DTT, 0.03% APS, TEMED) et migrés à 450V/5min/4°C, ensuite à 170V/3h/4°C à l'obscurité dans le tampon de migration (2X Tris-Glycine, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1% glycérol, 1mM DTT). La révélation du gel se fait avec le logiciel Typhoon 9000 en visualisant la fluorescence.

#### **2.2.1.2 EMSA avec Super Shift (SS)**

La préparation des échantillons se fait de la même façon que décrit pour un EMSA TAR traditionnel, mais on y rajoute un anticorps dirigé contre une des protéines en présence. Les tampons de réactions sont placés dans les tubes 1.5ml, suivis de 2.33-6.33µl des anticorps à essayer et les protéines d'intérêt, séquentiellement. Ce mélange est homogénéisé par tapotement, et ceci est laissé sur glace pendant une heure. Il faut également homogénéiser la réaction chaque 15 minutes. Ensuite, l'ARN TAR est ajouté et les échantillons sont laissés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. Ces échantillons sont par la suite chargés sur le même gel que décrit ci-haut. Les anticorps utilisés pour les super shifts sont : anti-GST B-14 (Santa Cruz : sc-138), anti-PICH115 (Santa Cruz : sc-271770), anti-Tat (abcam : ab43014), anti-HIP116 (Bethyl : A300-230A).



### **2.2.1.3 Quantification des complexes de GST-Tat et TAR**

Les intensités de signaux produits par les complexes formés lors des EMSA-TAR ont été quantifiées en duplicata par le logiciel ImageJ. Une fois les bandes sélectionnées et le signal normalisé en enlevant le bruit de fond, les données numériques générées ont été transférées sur Excel (Microsoft). Par la suite, l'intensité de liaison de GST-Tat à TAR a été calculée en générant des valeurs moyennes de deux expériences en présence et en absence de PICH-115. Ces données sont ensuite représentées par graphiques montrant les écarts types. Les données comparatives ont été normalisées à celles obtenues par la formation d'un complexe Tat/TAR avec Tat type sauvage, où son intensité de signal =1. Ceci est le cas pour le graphique à la figure 16B.

## 2.2.2 RÉSULTATS

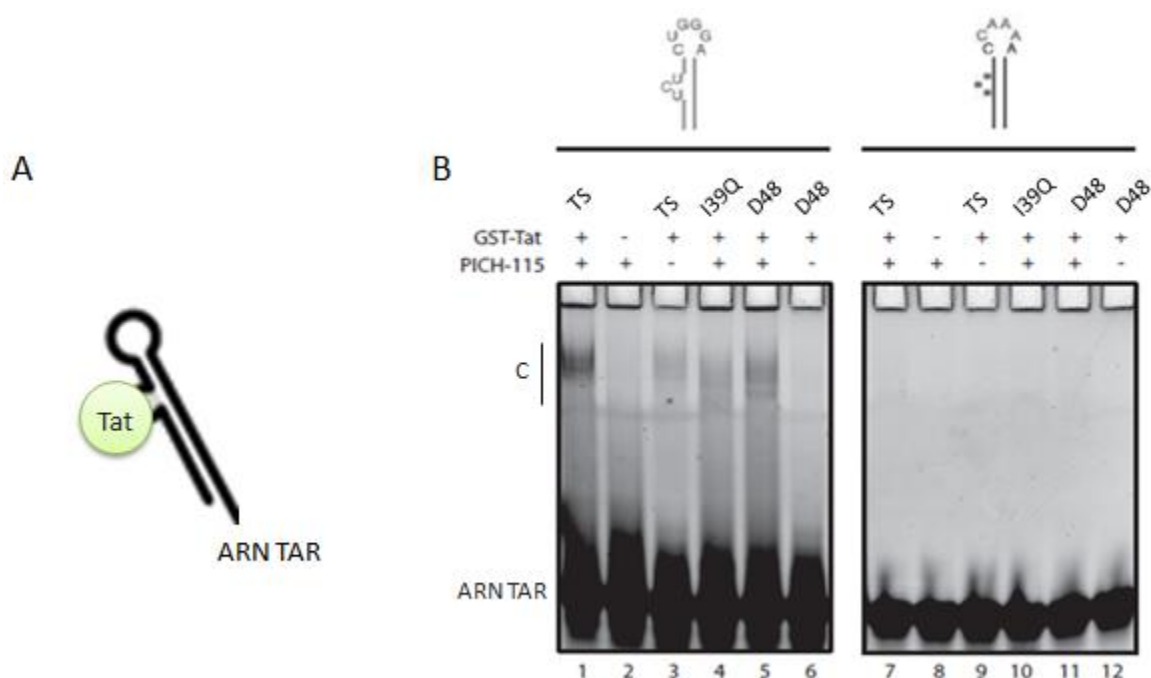
### 2.2.2.1 Tat lie TAR d'une manière spécifique en présence et en absence de PICH-115

Puisque notre essai est dans un contexte *in vitro*, nous voulions nous assurer que l'interaction entre les protéines recombinantes Tat et l'ARN TAR se fasse comme décrit dans la littérature. C'est-à-dire que Tat devrait reconnaître spécifiquement la structure secondaire en forme de bourgeon sur TAR et s'y associer. Pour tester ce phénomène, nous avons utilisé une sonde fluorescente contrôle de TAR, où le bourgeon est supprimé et la séquence de la boucle est mutée (UGGG → CAAA) (figure 17B, panneau de droite) : 5'-/5Cy3/rGrGrG rUrCrU rCrUrC rUrGrG rUrUrA rGrArC rCrArG rArGrA rGrCrC rCrArA rArArG rCrUrC rUrCrU rGrGrC rUrArA rCrUrA rGrGrG rArArC rCrC-3'. Cette sonde était préparée exactement comme celle du TAR type sauvage. Nous avons également utilisé des versions mutées de la protéine GST-Tat, une mutation ponctuelle et une délétion, pour évaluer les effets de ces mutations sur l'association spécifique de la protéine à TAR. D'après nos observations, la structure du bourgeon de TAR est toujours importante pour l'association entre l'ARN et la protéine GST-Tat, même dans les conditions que nous avons utilisées pour l'EMSA retrouvé sur le panneau gauche de la figure 17B. De plus, l'addition de PICH-115 dans une réaction contenant GST-Tat et TAR ne change pas le site de liaison entre Tat et TAR (figure 17B piste 1 et 7). En fait, bien que nous observions une augmentation de signal d'interaction entre le GST-Tat de type sauvage (TS) et TAR en présence de PICH-115, comparée au signal obtenu avec TAR et GST-Tat TS seul, on ne voit aucun complexe formé avec le TAR muté (figure 17, panneau de droite). La présence d'un faible signal d'interaction avec GST-Tat seul (figure 17B piste 3) peut être expliqué par le fait que Tat ait besoin d'un partenaire protéique pour mieux se lier à TAR. Dans le contexte de l'élongation de la transcription, ce partenaire est la Cycline T1 (Karn et al., 2012).

Dans le but de comparer l'interaction entre la protéine Tat TS et un mutant de Tat qui inhiberait sa fonction biologique de trans-activateur, nous avons décidé

d'utiliser le mutant I39Q dans cette expérience. Nous pouvons observer que le mutant GST-Tat I39Q peut lier l'ARN TAR en présence de PICH-115, cependant, le signal de complexe formé est plus faible que celui observé en présence d'une protéine Tat TS. En plus, on peut voir sur gel que le complexe assemblé par I39Q et TAR est légèrement plus petit, et donc migre un peu plus vite, que le complexe avec GST-Tat TS (figure 15, piste 4 versus piste 1), même si les deux protéines ont des poids moléculaires presque identiques. Le complexe I39Q/TAR migre au même niveau que celui formé à partir de la protéine GST-Tat tronquée,  $\Delta 48$ . Une interprétation possible serait que PICH-115 puisse altérer la conformation de la protéine pleine longueur I39Q de manière à former un complexe plus petit avec TAR.

La délétion GST-Tat  $\Delta 48$  ne contient plus les domaines riches en arginine et glutamine, ainsi que l'exon 2, situés au 3' de la protéine (voir figure 3 pour la carte de Tat). En absence de son motif de liaison à l'ARN, résidus 48-57, cette protéine tronquée devrait perdre sa capacité de se lier à TAR, ce qui est observé quand on la place seule avec l'ARN. Toutefois, figure 14B montre aussi qu'en rajoutant PICH-115 à la réaction de  $\Delta 48$ /TAR, on peut observer la formation d'un complexe nucléoprotéique (figure 15B, pistes 6-7). PICH-115 semble alors également amener un changement au niveau de la protéine tronquée qui lui permet de lier TAR.

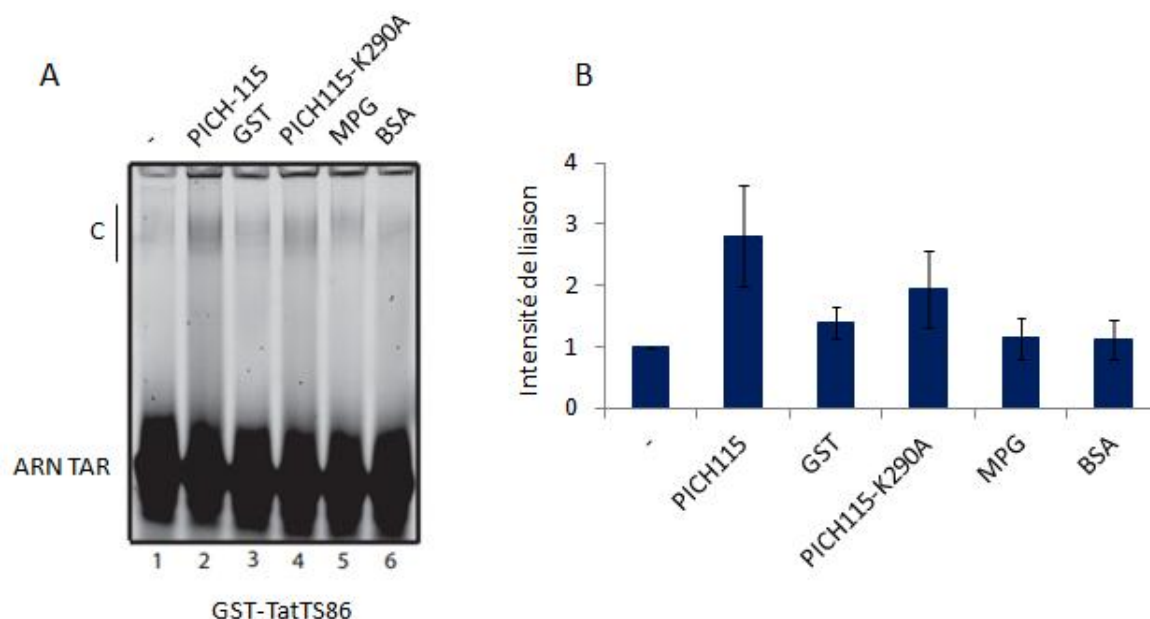


**Figure 17. Essai de spécificité d'interaction entre GST-Tat et ARN TAR par EMSA-TAR.** A. Modèle de l'interaction spécifique et sélective entre la protéine GST-Tat et la structure en forme de bourgeon de l'ARN TAR. B. Gel acrylamide natif. Le panneau de gauche montre un EMSA-TAR avec les protéines GST-Tat et PICH-115 en présence d'une sonde d'ARN TAR type sauvage. Le panneau de droite contient les mêmes échantillons en présence d'un TAR avec des mutations ponctuelles au niveau de la structure de boucle et sans bourgeon (les schémas des ARN utilisés sont placés au-dessus des panneaux). Les puits 1 et 7 contiennent les protéines PICH-115 et GST-Tat type sauvage (TS). Les puits 2 et 8 ne contiennent que PICH-115 avec l'ARN TAR. Les puits 3 et 9 ne contiennent que GST-Tat TS avec TAR. Les puits 4 et 10 contiennent la GST-Tat I39Q avec PICH-115. Les puits 5 et 11 contiennent la protéine GST-Tat tronquée, D48, avec PICH-115. Les puits 6 et 12 ne contiennent que la protéine GST-Tat D48 avec TAR. La barre verticale et la lettre C (pour complexes) placées à gauche du gel indiquent les complexes de protéines et TAR. La bande dans le bas du gel correspond à l'ARN TAR libre.

### ***2.2.2.2 L'enrichissement du complexe Tat-TAR est spécifique à la présence de PICH-115***

Puisque l'addition de PICH-115 augmentait même l'association des mutants Tat à TAR, nous voulions nous assurer que l'enrichissement du signal de complexe Tat/TAR était dû uniquement à la présence de PICH-115, et non de n'importe quelle protéine tertiaire. Pour ce faire, nous avons utilisé des protéines comme GST, BSA, une version de PICH-115 avec la mutation ponctuelle K290A qui inhiberait son activité ATPase, ainsi qu'une deuxième protéine nucléaire, MPG, qui est impliquée dans la réparation de l'ADN (Barnes et Lindahl, 2004). Chacune des différentes protéines a été ajoutée dans un mélange de GST-Tat/TAR ajusté pour compléter la composition de leur préparation protéique. Les mélanges finaux de réaction étaient très similaires en composition dépendant de quelles protéines y étaient présentes.

La liaison entre la protéine GST-Tat TS seule et TAR a été utilisée comme le niveau d'interaction de base dans le puits 1 de la figure 18A, représentée également par la première colonne sur le graphique 18B. D'après nos observations, les protéines PICH-115 TS et K290A (puits 2 et 4, respectivement) sont celles qui enrichissent considérablement l'association de Tat TS à TAR. En effet, on observe une augmentation du signal de liaison de 2,8 fois en présence de PICH-115 TS et de 1.95 fois en présence de PICH-115 K290A comparé à Tat TS seul. Par contre, en présence des protéines MPG et BSA (puits 5 et 6, respectivement), le signal du complexe ribonucléoprotéique est très similaire à celui visible avec seulement Tat TS (piste 1), montrant que ces protéines n'ont aucun effet d'enrichissement à l'association de Tat à TAR. Cette observation est confirmée par les deux dernières colonnes sur le graphique en 18B, qui montre une augmentation minimale d'interaction, soit de 1.13 fois, en présence de ces deux protéines tertiaires. Curieusement, l'addition de GST comme protéine tertiaire montre une légère augmentation du signal (1.3 fois) de liaison de Tat TS à TAR. Cette augmentation n'est toutefois pas comparable aux signaux obtenus par les protéines PICH-115.

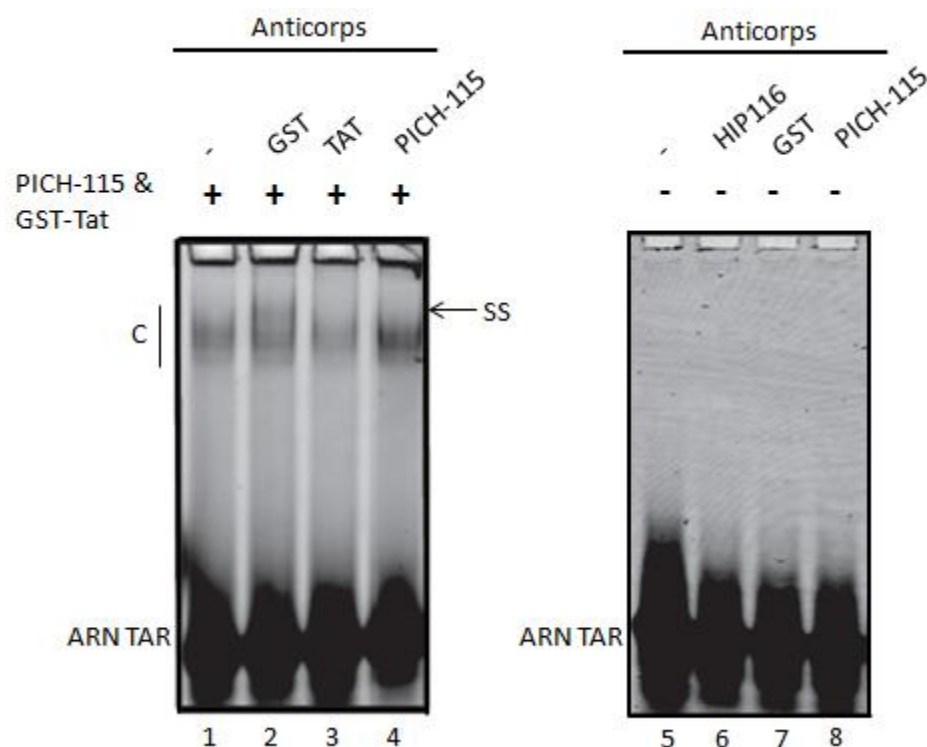


**Figure 18. Essai de spécificité de l'enrichissement de l'interaction entre GST-Tat et TAR.** A. Gel acrylamide natif révèle l'enrichissement de l'interaction entre GST-Tat TS et l'ARN TAR en présence de diverses protéines. Le puits 1 ne contient que la protéine GST-Tat TS. Le puits 2 contient la protéine PICH-115. Le puits 3 contient la protéine GST. Le puits 4 contient la protéine PICH-115 avec la mutation ponctuelle K290A inhibant son activité ATPase. Le puits 5 contient la protéine nucléaire MPG. Le puits 6 contient le contrôle négatif, la protéine BSA. B. Représentation en histogramme de l'intensité de la liaison de la protéine GST-Tat à l'ARN TAR dans les complexes observés sur gel en A, en présence des diverses protéines. (n=2)

### 2.2.2.3 PICH-115 n'est pas présent dans le complexe Tat/ TAR in vitro

Il était important de savoir si PICH-115 pouvait lier l'ARN TAR par l'intermédiaire de Tat, puisqu'après les premières expériences, notre protéine d'intérêt ne semblait pas lier, de façon stable, l'ARN seul, voir figure 17, piste 2. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des *super shifts* sur nos échantillons d'EMSA. Les anticorps  $\alpha$ -GST et  $\alpha$ -PICH-115 sont utilisés contre les protéines GST-Tat et PICH-115, respectivement. Dans le but de vérifier que les anticorps utilisés ne reconnaissent pas TAR de façon aspécifique, nous avons réalisé des EMSA TAR avec ces anticorps, en absence de protéines (figure 19, panneau de droite). Nous avons

alors utilisé l'anticorps anti-HIP116 comme contrôle négatif puisque nous savions qu'il ne reconnaissait point l'ARN (piste 6). Comme vu sur le panneau de gauche sur la figure 19, seul la protéine Tat semble faire partie du complexe avec TAR (piste 2). Ceci est visualisé par l'apparition d'une bande supplémentaire, retardée davantage sur gel avec l'addition d'un anticorps au complexe (annoté par un SS pour *super shift* à droite du panneau), au dessus de la bande contenant seulement Tat et TAR. L'anticorps dirigé contre PICH-115, dans le puits 4, ne montre pas ce *super shift*. Cependant, puisque l'anti-TAT utilisé dans la piste 3 ne montre pas de retardement supplémentaire sur gel non plus, nous nous sommes dit qu'il est possible que l'anticorps contre PICH-115 soit inefficace pour des *super shifts* en EMSA. Donc, nous avons réalisé des *super shifts* avec des anticorps dirigés contre les étiquettes FLAG et HIS fusionnées à la protéine PICH-115 en N-terminal et en C-terminal, respectivement (données pas montrées ici). Aucun des anticorps n'ont démontré que PICH-115 faisait physiquement partie du complexe Tat/TAR.



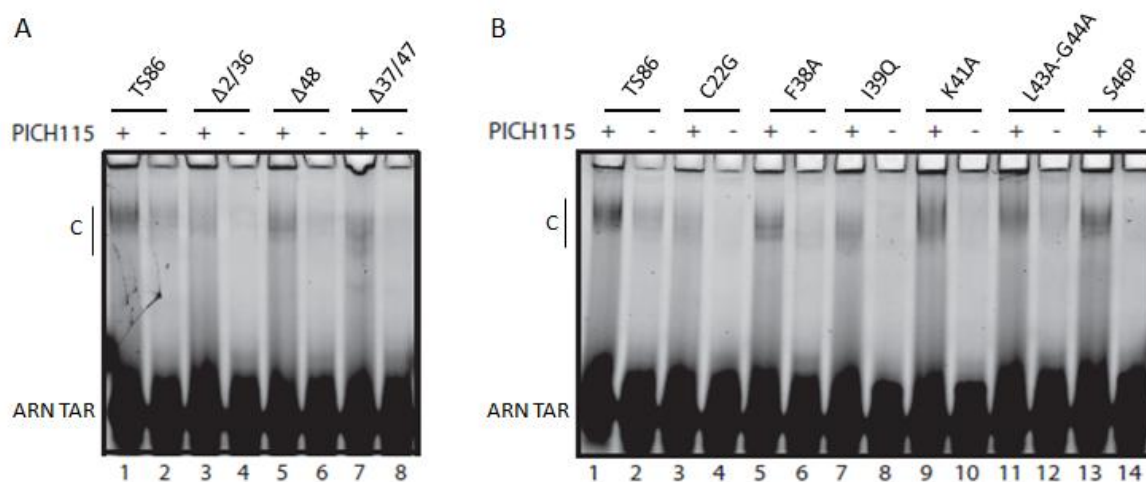
**Figure 19. Test des anticorps de *Super Shift* (SS) contre PICH-115 et GST-Tat dans un EMSA TAR.** Gels acrylamide natifs. Le panneau de gauche montre l'effet de l'ajout des anticorps au complexe ribonucléoprotéique. Le panneau de droite montre l'effet des anticorps sur l'ARN TAR seul. Les puits 1 et 5 ne contiennent aucun anticorps. Les puits 2 et 7 contiennent l'anticorps anti-GST. Les puits 4 et 8 contiennent l'anticorps anti-PICH115. Les puits 3 et 6 contiennent les anticorps anti-TAT et anti-HIP116, respectivement. La flèche sur le gel du panneau de gauche pointe vers un *super shift* observé sur la piste 2, avec l'anticorps anti-GST.

#### 2.2.2.4 PICH-115 facilite l'interaction entre Tat et TAR

En voyant l'effet d'enrichissement du signal de liaison du mutant I39Q de Tat à l'ARN TAR en présence de PICH-115, nous voulions évaluer l'interaction entre TAR et les autres mutants de GST-Tat en absence et en présence de PICH-115. Dans cet essai, nous avons utilisé les délétions de GST-Tat suivantes :  $\Delta 2/36$ , où le domaine N-terminal, jusqu'au domaine central, est enlevé;  $\Delta 48$ , où le domaine C-terminal, à partir du domaine central, est enlevé;  $\Delta 37/47$ , où le domaine central est enlevé. Ces protéines tronquées sont comparées au GST-Tat TS dans la figure 20A, et on peut voir



que, dans ces expériences, les protéines  $\Delta 2/36$  et  $\Delta 37/47$  qui contiennent toujours le motif de liaison à l'ARN interagissent le moins avec TAR en absence de PICH-115 (pistes 4 et 8, respectivement). Quant à  $\Delta 48$ , son association avec TAR (piste 6) est plus forte que les deux autres délétions, et l'enrichissement de son interaction avec TAR en présence de PICH-115 (piste 5) est aussi supérieur comparé aux autres délétions (pistes 3 et 7). Le profil d'interaction basale, c'est-à-dire en absence de PICH-115, des ces différentes protéines tronquées suggère que la liaison de Tat dépend d'une conformation apportée par les domaines central et N-terminal, et non seulement du motif de liaison à l'ARN. Dans tous les cas de délétion, les complexes formés en présence de PICH-115 sont plus petits en taille que celui formé avec GST-Tat TS, ce qui était ce qu'on prévoyait. Cependant, dans les puits contenant  $\Delta 37/47$  (pistes 7 et 8), on peut observer une trainée ou bien plusieurs complexes de tailles différentes, en présence et en absence de PICH-115, suggérant que la délétion génère plusieurs repliements différents qui forment des complexes avec des mobilités variées sur gel.



**Figure 20. Comparaison des complexes formés avec l'ARN TAR et différents mutants de GST-Tat.** Gels acrylamide natifs. A. Formation des complexes par GST-Tat TS et des versions de protéines tronquées et l'ARN TAR, en présence et en absence de PICH-115. B. Formation des complexes par GST-Tat TS et des versions de Tat avec des mutations ponctuelles et l'ARN TAR, en présence et en absence de PICH-115. Voir figure 13 pour plus d'informations sur les mutants de GST-Tat utilisés.

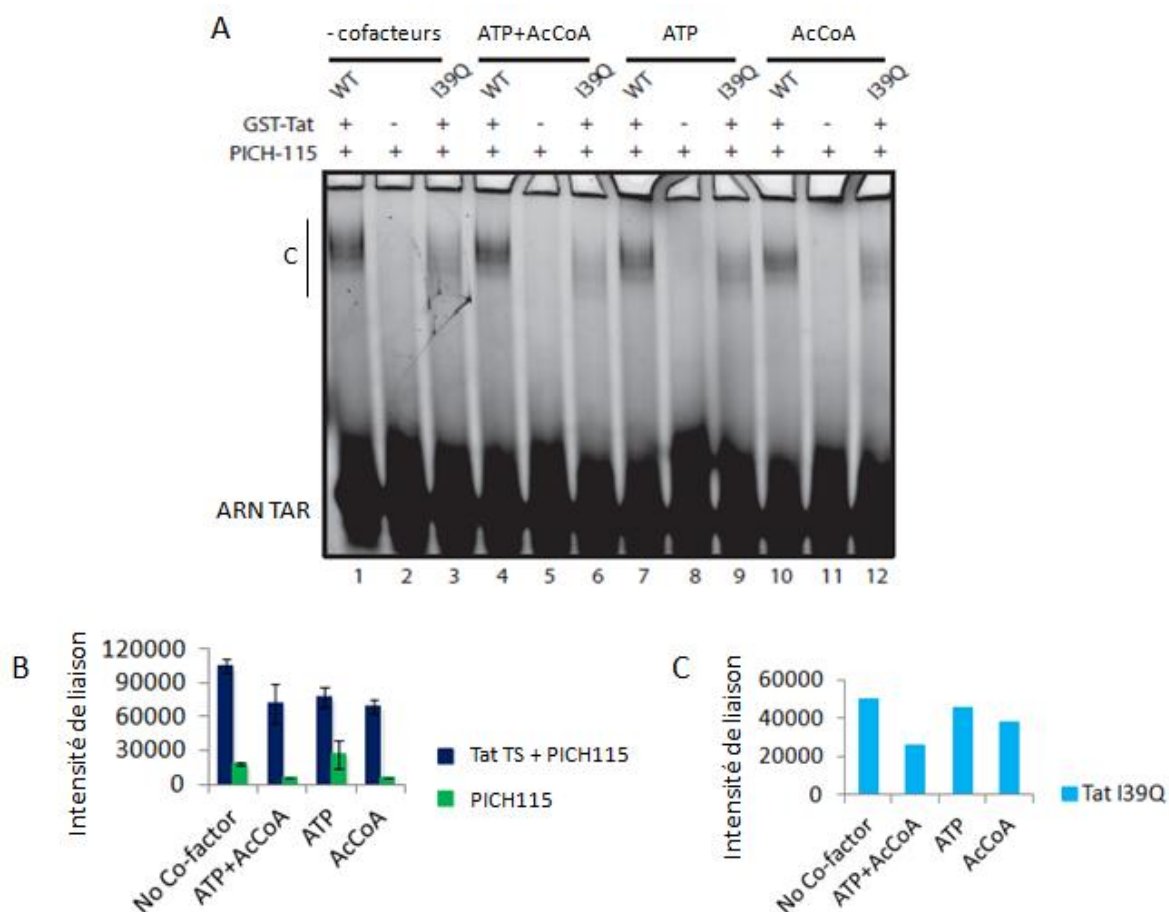
Le mutant L43A-G44A (figure 20B, pistes 11 et 12), que nous avons créé dans une région à l'intérieur du domaine central de la protéine Tat ayant une pseudo-homologie avec PICH-115, peut lier TAR autant que la protéine de type sauvage avec ou sans PICH-115. Cette observation était plus ou moins attendue puisque cette double mutation ponctuelle n'a jamais été caractérisée dans Tat comme étant inhibitrice de ses fonctions. Cependant, les mutants comme F38A, I39Q, K41A et S46P qui sont tous des mutations ponctuelles dans le domaine central de Tat, sont très bien connus pour inhiber la trans-activation du VIH (Dey et al., 2012; Ronsard et al., 2014; Kashanchi et al., 1994; Meyerhans et al., 1989). Ces mutations sont également celles qui interagissent très faiblement avec TAR quand elles sont seules avec l'ARN (figure 20B, pistes 6,8,9 et 14, respectivement). Toutefois, le signal du complexe Tat/TAR est presque aussi fort en présence de PICH-115 que celui avec GST-Tat TS pour les mutants K41A et S46P (figure 20B, pistes 9 et 13). Ces complexes se forment également à la même mobilité que celui avec le TS. Ceci montre que ces mutations ponctuelles peuvent affecter l'interaction entre TAR et GST-Tat seul sans nécessairement influencer leur interaction avec PICH-115 qui lui faciliterait leur encreage à TAR. D'autre part, comme constaté auparavant, la mutation I39Q lie TAR plus faiblement que la protéine TS et ce complexe Tat/TAR migre plus vite aussi (figure 20B, piste 7). Cette différence de mobilité est également observée avec la protéine mutée, F38A, qui génère une très faible trainée sur la piste de migration lorsqu'elle est seule avec l'ARN TAR (figure 20B, piste 5). En présence de PICH-115, on peut observer 3 bandes distinctes, toutefois migrant toutes les trois plus bas que le complexe formé par GST-Tat TS. Ceci pourrait suggérer que le mutant F38A de Tat subit des changements de conformation, en présence et en absence de PICH-115, alors qu'il essaie de former un complexe avec TAR, laissant ainsi plusieurs bandes sur gel. Une des observations qui mérite attention est celle du complexe ribonucléo-protéique formé par GST-Tat C22G et TAR (pistes 3 et 4). Cette mutation dans le domaine activateur, en amont du domaine central, abolit l'interaction physique de Tat avec Cycline T1 en perdant son capacité de lier des ions de zinc qui gardent les deux protéines ancrées l'une à l'autre (Garber et al., 1998). Ce mutant qui, ici, ne lie presque pas du tout TAR seul, est assisté par la présence de PICH-115 pour former un

complexe nucléoprotéique avec un facteur d'enrichissement de signal = 4. L'association de Tat à l'ARN TAR nécessite bien sûr le motif riche en arginine, donc le domaine basique, cependant il nécessite également des résidus retrouvés dans les autres régions de la protéine Tat pour assurer une conformation stable qui maintient l'interaction de la protéine avec les acides ribonucléiques (Tahirov et al., 2010). La mutation ponctuelle C22G est importante pour la liaison de Tat à TAR, puisque seule la protéine n'est point capable de lier TAR (figure 20B, piste 4), et le fait que l'addition de PICH-115 montre une augmentation de liaison suggère que PICH-115 encourage l'adoption d'une conformation de Tat qui favorise son interaction avec TAR.

#### ***2.2.2.5 Les activités enzymatiques de PICH-115 ne sont pas requises pour l'enrichissement de l'interaction Tat/TAR***

La protéine PICH-115 possède des activités enzymatiques d'ATPase et d'acétyl transférase *in vitro* (Ito et al., 2014). De plus, PICH-115 est capable d'acétyler et stabiliser le gardien du génome, p53, lors des dommages à l'ADN, dans plusieurs lignées cancéreuses (Liu et al., 2016). Naturellement, nous voulions savoir si ces activités étaient nécessaires pour faciliter la liaison entre Tat et TAR. Alors, nous avons réalisé une série d'expériences qui comparaient l'effet de PICH-115 sur l'interaction Tat/TAR dans des mélanges de réaction avec ou sans les métabolites cofacteurs de PICH-115, ATP et acétyl-coenzyme A (AcCoA). Pour ces tests, on a évalué l'interaction des protéines GST-Tat TS et le mutant Tat-I39Q avec TAR en présence de PICH-115, ainsi que TAR et PICH-115 seul (figure 21). Nos résultats sur gel montrent que l'addition des deux cofacteurs de PICH-115 ensemble dans les mélanges de réaction n'a pas un effet considérable sur l'augmentation de la liaison des protéines Tat à l'ARN TAR : au contraire, le signal de complexe est plus faible comparés aux échantillons sans métabolites (figure 21A pistes 4 et 5 versus 1 et 2). De plus, l'addition séparée des cofacteurs ATP (pistes 7-9) et AcCoA (pistes 10-12) ne montre pas de différences notoires, ni d'améliorations de signal d'interaction comparée aux échantillons sans métabolites (figure 21A pistes 1-3). Effectivement, la

représentation graphique des signaux de complexes montre que l'enrichissement de liaison est le plus fort en absence des cofacteurs ATP et AcCoA. Ceci nous laisse conclure que l'enrichissement de l'association entre Tat et l'ARN TAR ne nécessite pas les activités enzymatiques d'ATPase ni d'acétyl transférase de la protéine PICH-115. PICH-115 semble donc influencer la formation du complexe Tat/TAR par sa simple présence dans la réaction sans ses activités d'ATPase et d'acétyl transférase *in vitro*.



**Figure 21. Essai EMSA-TAR avec les cofacteurs de PICH-115.** A. Gel acrylamide avec ou sans les cofacteurs de PICH-115 pour évaluer leur effet sur l'interaction entre GST-Tat et l'ARN TAR. Les puits 1-3 contiennent des échantillons sans cofacteurs. Les puits 4-6 contiennent des échantillons avec les deux cofacteurs de PICH-115, ATP et acétylcoenzyme A (AcCoA). Les puits 7-9 contiennent des échantillons avec seulement ATP et les puits 10-12 avec seulement AcCoA. Les puits 1,4,7 et 10 contiennent la protéine GST-Tat TS. Les puits 2,5,8,11 ne contiennent aucune protéine GST-Tat, mais seulement PICH-115 en présence de TAR. Les puits 3,6,9,12 contiennent une protéine GST-Tat avec la mutation ponctuelle I39Q. B. Représentation en histogramme de l'intensité de la liaison de GST-Tat à l'ARN TAR (en bleu marin) ou de PICH-115 à l'ARN TAR sans GST-Tat (en vert), en présence ou en absence des cofacteurs. C. Représentation en histogramme de l'intensité de la liaison de la protéine GST-Tat I39Q à l'ARN TAR en présence ou absence des cofacteurs de PICH-115.

## DISCUSSION

Le virus de l'immunodéficience humaine infecte et tue des millions de personnes depuis plus de trente ans. Ce virus cible le système immunitaire de ses victimes et les rend susceptibles à plusieurs types de maladies opportunistes, comme la tuberculose, la pneumonie et même certains types de cancers. Les médicaments anti-rétroviraux (ART) qui existent aujourd'hui peuvent atténuer l'infection au VIH et retarder son développement en SIDA, sans toutefois éradiquer le virus. Les publications traitées dans l'introduction de ce mémoire montrent à quel point les mécanismes d'action des diverses protéines virales sont étudiés et connus. Ce sont d'ailleurs ces études fondamentales qui ont mené au développement de ces drogues ART que l'on prescrit aux individus séropositifs (Xing et Siliciano, 2014). Curieusement, il existe toujours une faille dans l'étude du cycle réplcatif du VIH, plus précisément au niveau de l'initiation de la transcription. En effet, la pré-initiation de la transcription est un phénomène qui subit une régulation stricte par divers mécanismes cellulaires pour assurer l'expression correcte des bons gènes. Cette supervision est entretenue par des facteurs cellulaires impliqués dans plusieurs voies de signalisation qui dépendent de diverses stimulations extracellulaires et intracellulaires (NF $\kappa$ B, PKC). Par conséquent, lors d'une infection, ces facteurs cellulaires sont détournés de leurs rôles natifs et reprogrammés pour servir d'activateurs pour l'expression du provirus par des protéines régulatrices virales, comme Tat et Rev (Naji et al., 2012). De plus, les signaux de régulation de l'expression du génome du VIH, soit positifs ou négatifs, convergent tous au promoteur central, TASHET. La trans-activation de la transcription du VIH par sa protéine Tat dépend aussi de la séquence intacte de TASHET, même en présence de son partenaire d'élongation Cycline T1, montrant effectivement que le contrôle de la trans-activation se produit à l'étape d'initiation, par des facteurs cellulaires de pré-initiation de la transcription (Wilhelm et al., 2012). De plus, comme mentionné en introduction, l'éradication du virus dans un patient infecté doit coupler les traitements ART avec des stratégies de guérisons stérilisantes et même pour développer des méthodes plus fonctionnelles qui visent à endogénéiser le virus.

Pour ce faire, l'étude de la régulation du cycle viral au niveau de la trans-activation de la transcription via l'élément TASHET du promoteur du VIH est primordiale.

### ***3.1 PICH-115, UN NOUVEAU COFACTEUR CELLULAIRE DE LA PROTÉINE VIRALE TAT***

Les résultats de ce mémoire montrent les mécanismes derrière l'implication de la protéine cellulaire, PICH-115, dans la transcription du VIH en agissant comme un cofacteur pour la protéine virale Tat. En effet, les rôles de PICH-115 dans la transcription virale n'ont jamais été bien décrits, même si la protéine a été liée à la réplication virale. PICH-115, aussi connu sous le nom de hALP et Nat10, a été décrit au tout début comme une protéine qui interagissait avec le promoteur de la télomérase humaine et activait sa transcription par le biais de l'acétylation des histones. Cette protéine peut également interagir avec l'ARN de la télomérase, hTR, *in vitro*. Sa localisation dans le nucléole et sa surexpression lors de la cytokinèse dans le but d'acétyler la tubuline et faciliter la division cellulaire ont également été documenté dans la littérature (Lv et al., 2003; Shen et al., 2009). Bien qu'au départ la fonction de cette protéine semblait être concentrée sur l'acétylation de protéines nucléaires, ses homologues dans les organismes comme la bactérie, la levure, et même la souris, avaient tous pour fonction d'acétyler l'ARN. Cette fonction est a été démontrée chez l'humain par Tan et al. en 2013 et par Wang et al. en 2015. Ces deux équipes ont montré que PICH-115 acétyl les ARN ribosomiaux ainsi que les ARN de transfert dans les cellules humaines. Les publications précédentes de Brass et al., et Gauthier et al., qui soulèvent la question de la présence de PICH-115 dans la transcription et la réplication du VIH par des expériences non-biaisées de criblage siRNA et protéomique, soutiennent que les résultats montrés dans ce mémoire sont d'une grande importance puisqu'ils servent à placer PICH-115 dans la machinerie de transcription virale. Plus précisément, le contenu de ce mémoire permet de déceler le rôle putatif de PICH-115, comme un cofacteur de la protéine virale, Tat, pour trans-activer la transcription du VIH. Naturellement, puisque PICH-115 peut lier et acétyler l'ARN, la

deuxième partie de mon projet était de voir quel serait le rôle de PICH-115 en présence de l'ARN régulateur du VIH, TAR.

### **3.1.1 Cartographie de l'interaction entre PICH-115 et Tat**

Les résultats présentés dans ce mémoire sont les premiers à montrer que la protéine régulatrice virale Tat interagit physiquement avec la protéine cellulaire PICH-115. De plus, leur interaction est démontrée comme étant directe, sans le biais d'ARN. La protéine PICH-115 est recrutée à l'ADN du promoteur central du VIH, TASHET, par l'intermédiaire d'un complexe qu'elle forme avec deux autres protéines cellulaires, l'une d'entre elles liant TASHET de manière spécifique. C'est avec la formation de ce complexe de pré-initiation de transcription que PICH-115 vient au contact de la protéine Tat. Cette interaction protéique a été observée auparavant dans notre laboratoire par immuno-précipitation (IP) avec un FLAG-Tat surexprimé dans les cellules HeLa. Cette expérience nous a permis de voir que dans une cellule, la protéine endogène PICH-115 peut interagir avec Tat. Cependant il est possible cette interaction, *in cellulo*, se fasse par l'intermédiaire d'autres protéines ou même des ARN, puisque les deux protéines peuvent lier l'ARN. Si on voulait considérer PICH-115 comme un cofacteur de la protéine Tat, il fallait tout d'abord prouver que l'association de ces deux protéines était directe et pouvait être utilisée comme cible thérapeutique. Le GST-Pulldown, réalisé *in vitro* avec des protéines recombinantes purifiées, en absence d'ARN, nous a justement permis d'observer une interaction physique, directe, non-biaisée et surtout spécifique entre les deux protéines.

### **3.1.2 Les domaines central et basique de Tat sont nécessaires pour interagir avec PICH-115**

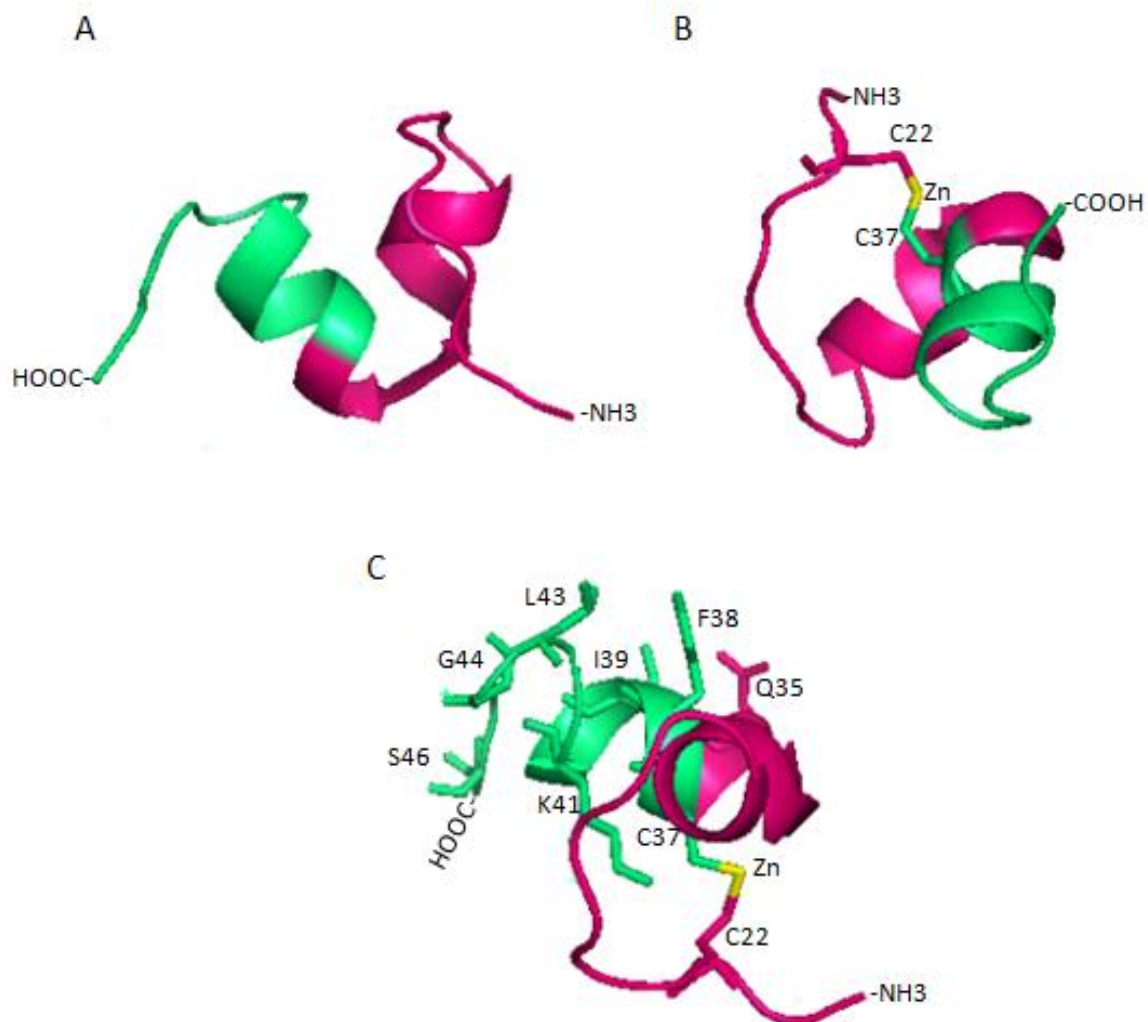
D'après nos résultats, nous avons pu conclure que l'interaction entre PICH-115 et Tat exigeait que les domaines central et basique chez la protéine Tat soient présents. En effet, on peut toujours voir une liaison entre les deux protéines lorsqu'on supprime



le domaine N-terminal avec la délétion  $\Delta 2/36$ , ne laissant que le domaine central fusionné avec l'étiquette GST en N-terminal, et cette interaction est plus forte que celle avec une protéine GST-Tat-TS. Cette augmentation d'interaction est également observée quand on supprime seulement l'exon 2 avec la mutation  $\Delta 72$ . Cependant, l'interaction entre la protéine GST-Tat tronquée au résidu 57, directement à la fin du domaine basique, et PICH-115 est la plus forte. Selon la structure de Tat, en complexe avec P-TEFb (Tahirov et al., 2010), cette délétion pourrait exposer les domaines central et basique en C-terminal augmenter sa liaison avec PICH-115, probablement parce qu'elle rendrait les domaines d'interaction plus accessibles à notre protéine d'intérêt.

Nous avons également noté que la perte du domaine basique, contenant le motif riche en arginine nécessaire pour la liaison de Tat à l'ARN et à d'autres protéines cellulaires, dont I $\kappa$ B $\beta$ , montre une diminution considérable de la liaison de PICH-115 à Tat. Cependant, c'était la perte du domaine central de Tat qui affaiblissait l'interaction protéique d'une façon encore plus majeure. Ce domaine serait donc indispensable pour la liaison à PICH-115. Cette perte de liaison peut s'expliquer par le changement de conformation structurelle que subirait Tat quand le domaine central est supprimé (figure 22). Cette observation nous a semblé intéressante puisque le domaine central est utilisé par Tat pour interagir avec plusieurs facteurs nucléaires nécessaires à la transcription du provirus, dont notamment la protéine Cycline T1 du complexe P-TEFb. Comme mentionné auparavant, la liaison entre Tat et Cycline T1 est très documentée et l'interaction est cartographiée à l'acide aminé près. L'interaction entre ces deux protéines se fait lorsqu'il y a une stabilisation de deux atomes de zinc, le premier, Zn1, est lié par les résidus C22, H33, C34, dans le domaine d'activation, et le résidu C37 du domaine central, de la protéine Tat. Le deuxième atome de zinc est tenu en place par les résidus C25, C27, C35 de la protéine Tat et le résidu C231 de Cycline T1. En fait, le domaine central (résidus 37-47) de la protéine Tat se retrouve sous forme d'hélice alpha qui se retourne pour permettre l'interaction entre C37 et le premier atome de zinc, montré dans la figure 22.

Par contre, d'après nos résultats, la délétion du domaine d'activation de Tat qui commence au résidu 20 et se termine au résidu 36 augmente l'interaction entre Tat et PICH-115. Cette délétion pourrait avoir le même effet sur le repliement de Tat que la délétion du domaine N-terminal, puisqu'elle enlèverait le résidu 22 dans le domaine d'activation qui complète le pont de zinc avec le résidu 37 du domaine central. Ensemble, ces résultats suggèrent que l'interaction entre PICH-115 et Tat dépendrait de la structure d'hélice qu'a le domaine central (vu en vert dans la figure 22) plutôt que le repliement de la protéine entière grâce au pont de zinc entre les domaines d'activation et central.



**Figure 22. Structure 3D de la protéine Tat.** Sur ce modèle on peut voir le domaine d'activation en rose et le domaine central en vert. A. La première moitié du domaine central de la protéine Tat forme la majorité de la deuxième hélice alpha. Le repliement de cette structure le rapproche du domaine d'activation, aussi appelé domaine riche en cystéines. B. Les résidus C22 et C37 forment des doigts de zinc et ainsi interagissent ensemble pour stabiliser un atome de zinc (en jaune), ce qui rapproche les deux domaines l'un de l'autre. C. Les résidus étudiés et modifiés pour ce projet sont montrés en format bâtonnets sur le modèle de la protéine Tat. (Modifié à partir de Tahirov et al., 2010)

Comme vu dans la littérature, les résidus se retrouvant dans le domaine central de la protéine virale Tat sont également nécessaires pour non seulement l'interaction entre Cycline T1 et Tat, mais aussi pour l'activation de Cycline T1 par Tat. Justement

les résidus Q35, F38, I39 et K41 dans la protéine Tat sont tous importants pour la trans-activation de la transcription du génome du VIH, par la voie de recrutement et activation du P-TEFb, et la majorité se retrouvent dans le domaine central. Il est intéressant de voir que les résidus qui sont importants pour les fonctions biologiques de Tat dans un contexte d'infection au VIH ne sont pas forcément essentiels pour son interaction avec notre protéine cellulaire d'intérêt, PICH-115.

La mutation au résidu I39 de la protéine virale Tat fait partie d'une co-mutation, avec une deuxième retrouvée sur le résidu Q35, conservée à travers l'évolution du VIH. Seule, la mutation I39Q nuit à l'aptitude biologique du virus en compromettant la trans-activation de la transcription virale par la protéine Tat. En fait, cette mutation permet toujours à Tat de lier son partenaire Cycline T1, mais l'empêche d'activer P-TEFb. La mutation au résidu Q35, quant à elle, inhibe l'association de la protéine Tat à la protéine cellulaire Cycline T1. Alors, la présence d'une mutation ou de l'autre empêche la protéine virale Tat de réaliser sa fonction biologique de trans-activateur de la transcription du génome du VIH. La présence d'une co-mutation, donc une mutation ponctuelle aux deux sites simultanément, permet le rétablissement du niveau de trans-activation de transcription très proche à un Tat de type sauvage (Dey et al., 2012). De façon similaire, on peut observer avec les résultats présentés dans ce mémoire que le double mutant Q35L-I39Q de Tat lie PICH-115 avec une intensité très comparable à l'interaction entre PICH-115 et Tat TS (figure 14B). Puisque cette co-mutation engendre un phénotype de Tat type sauvage, quant à sa fonction, cette observation d'association entre PICH-115 et les deux versions de Tat ne nous semble pas surprenant.

La modification du résidu de cystéine à la position 22 de Tat, qui forme un doigt de zinc à partir du domaine d'activation, semble toutefois avoir un léger impact sur la liaison entre Tat et PICH-115. Le remplacement de cet acide aminé par une glycine enlève la propriété de Tat de former un doigt de zinc, ce qui, dans ce cas, augmente légèrement son interaction avec PICH-115. Cette observation peut s'expliquer par le fait que la mutation de C22G permet la libération de la structure

tridimensionnelle de Tat où le domaine central se replie avec le domaine d'activation (figure 20). Cette mutation servirait alors à enlever le domaine d'activation de par-dessus le domaine central, qui est essentiel à la liaison entre ces deux protéines, pour que PICH-115 puisse mieux s'y lier. L'effet de C22G pourrait, dans ce cas, être le même que la délétion du domaine d'activation de Tat ( $\Delta 2/36$ ). Les autres mutations ponctuelles à l'intérieur de Tat, telles que Q35L, F38A, I39Q et K41A, n'influencent sa liaison avec PICH-115 que très moindrement *in vitro*, selon les résultats obtenus par GST-Pulldown. Ceci peut suggérer que la partie de l'hélice alpha formée par le domaine central n'est pas compromise par la présence d'une mutation ponctuelle.

### **3.2 PICH-115 AUGMENTE L'INTERACTION ENTRE GST-TAT ET TAR**

L'interaction entre Tat et l'ARN naissant de la transcription du promoteur du VIH, TAR, est essentiel à la trans-activation du VIH. L'interaction ribonucléoprotéique observée, *in vitro*, est directe, au niveau la structure en forme de bourgeon de TAR et le motif de reconnaissance à l'ARN (RRM) de la protéine Tat (Churcher et al., 1993; Kingsmen et Kingsmen, 1996). Il est également connu que la présence de Cycline T1, qui lie à la fois Tat et TAR, rend la liaison entre Tat et TAR plus forte et plus stable (D'Orso & Frankel, 2010). Tout comme Cycline T1, notre protéine d'intérêt PICH-115, interagit directement avec Tat *in vitro*, comme montré par les résultats d'interaction protéine-protéine par GST-Pulldown. Nous avons donc analysé l'impact qu'a la présence de PICH-115 dans une réaction d'interaction entre Tat et TAR.

#### **3.2.1 PICH-115 amène un changement à Tat pour assurer une meilleure liaison à TAR**

Selon nos expériences, la protéine GST-Tat lie assez faiblement à l'ARN TAR, ce qui est attendu puisqu'elle nécessite un cofacteur pour une interaction enrichie. Nos résultats montrent que PICH-115 n'interagit pas avec TAR seul et n'est pas plus

présent dans le complexe formé par Tat et TAR (figures 17&19). Cependant, le simple fait que PICH-115 soit présent dans la réaction assure un enrichissement de signal produit par la formation d'un complexe protéine-ARN. Ce phénomène semble être spécifique à la protéine PICH-115, puisque l'addition de n'importe quelle protéine, dont GST et BSA, ne semble pas pouvoir recréer l'intensité du signal de complexe généré par l'ajout de PICH-115. La spécificité de l'enrichissement du signal à PICH-115 est très encourageante puisque cela solidifie notre hypothèse selon laquelle PICH-115 est un cofacteur de Tat. De plus, cet effet d'amplification de liaison Tat/TAR est visible même avec les mutants de Tat qui, seuls, ne peuvent point lier TAR. Ces résultats suggèrent donc que l'interaction spécifique entre Tat et PICH-115 peut altérer la protéine Tat de façon à la rendre plus efficace à interagir avec l'ARN TAR, sans que PICH-115 fasse physiquement partie du complexe formé. Cette hypothèse est soutenue par l'association du mutant de Tat dépourvu de son domaine d'activation ( $\Delta 2/36$ ), contenant des résidus nécessaires à l'interaction Tat/TAR, avec TAR en absence et en présence de PICH-115. Alors que la protéine Tat tronquée seule ne puisse aucunement former un complexe avec TAR (figure 20), PICH-115 semble pouvoir permettre l'association entre Tat et TAR.

Pour ce qui est des versions tronquées de Tat qui ne lient que très peu ou pas PICH-115, dont  $\Delta 48$  et  $\Delta 37/47$  respectivement, on peut toujours observer une augmentation du signal de complexe Tat/TAR en présence de PICH-115 comparé au niveau d'association des protéines seules à l'ARN TAR. Puisqu'on peut voir un complexe très faible formé par  $\Delta 48$ , qui est dépourvu de son domaine basique contenant le motif de liaison à l'ARN, on peut considérer que les résidus intacts dans les domaines d'activation et central sont suffisants pour moindrement interagir avec l'ARN TAR. Ainsi, même si l'interaction protéine-protéine entre PICH-115 et  $\Delta 48$  est très faible, la présence de PICH-115 est capable d'enrichir la formation du complexe Tat/TAR d'une manière considérable. Cependant, la délétion du domaine central de Tat,  $\Delta 37/47$ , montre les mêmes niveaux d'interaction avec TAR que ceux observés avec le mutant  $\Delta 2/36$ , avec et sans PICH-115. Ce résultat nous a semblé surprenant puisque ces deux délétions se comportent de façon complètement opposée quant à leur

liaison à PICH-115. Ainsi, même si on ne peut pas confirmer qu'il y ait une corrélation directe entre l'interaction physique des protéines GST-Tat/PICH-115 et l'enrichissement de la formation du complexe Tat/TAR, il est intéressant de voir que la délétion qui lie fortement PICH-115,  $\Delta 2/36$ , puisse former le complexe protéine/ARN le moins enrichi, en présence de PICH-115.

### 3.2.2 *PICH-115 agit comme une protéine chaperonne de Tat*

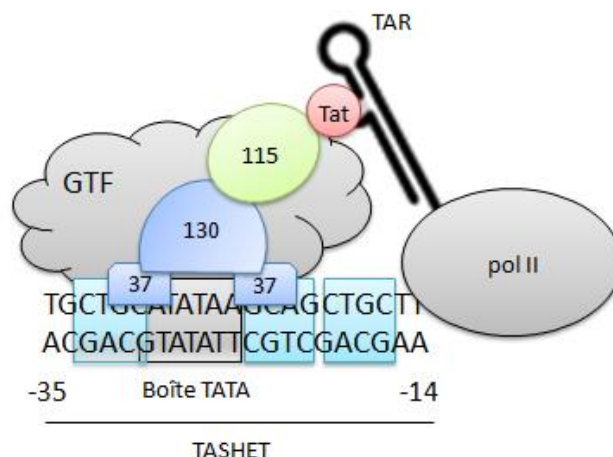
À plusieurs reprises, la protéine nucléolaire PICH-115 a été démontrée comme une enzyme qui acétyle à la fois l'ARN et des protéines chez l'humain. Son activité enzymatique d'acétyl transférase est couplée à une activité ATPase. Donc PICH-115 nécessite à la fois une molécule d'acétyl coenzyme-A et d'ATP pour pouvoir accomplir sa fonction biologique dans une cellule (Chimnaronk et al., 2009; Suzuki et al., 2014). Cependant, dans le contexte du VIH, très peu est connu quant à sa fonction et l'utilité de ses activités enzymatiques. En fait, la présence de PICH-115 dans l'interactome de Tat et du VIH n'a été observée que de façon indirecte jusqu'à maintenant (Gauthier et al., 2009; Brass et al., 2008). D'après les résultats présentés dans ce mémoire, nous pouvons proposer que la protéine PICH-115 agit comme une protéine chaperonne en assistant l'adoption de la bonne conformation par la protéine virale Tat dans le but de mieux lier l'ARN viral TAR. En fait, dans l'EMSA présenté à la figure 21, nous pouvons observer qu'avec l'ajout des métabolites, acétyl-CoA et ATP, qui sont essentiels au fonctionnement des activités enzymatiques de PICH-115, on ne voit pas une amélioration du signal du complexe formé par TAR/Tat. De plus, d'après la représentation graphique du gel de l'EMSA, figure 21B, nous pouvons conclure que l'absence des métabolites résulte en un signal d'interaction supérieur entre la protéine viral Tat et l'ARN TAR comparés aux essais de cofacteurs. Puisque nous n'avons pas été capables de confirmer que PICH-115 interagisse directement avec l'ARN TAR avec des *super shifts* réalisés avec des anticorps spécifiques contre PICH-115 (figure 19), nous proposons que notre protéine d'intérêt agirait plutôt comme une chaperonne pour la protéine Tat. Ce rôle ne semble pas tout à fait impossible puisque la protéine

PICH-115 a également été identifiée comme un facteur qui régulerait l'activité d'un autre complexe ribonucléoprotéique, l'ORF1 des rétrotransposons LINE1 (L1). En effet, une surexpression de PICH-115 causerait une diminution de près de 50% de l'activité de rétrotransposition du L1 dans les cellules HEK293 (Goodier et al., 2013). Il ne serait donc pas tout aussi invraisemblable de penser que PICH-115 pourrait chaperonner le complexe Tat/TAR, mais dans le cas du VIH comparé à l'ORF1, PICH-115 aiderait l'activation de la transcription.

### 3.3 CONCLUSION

En guise de conclusion, je voudrais souligner que les résultats présentés dans ce mémoire montrent que la protéine cellulaire PICH-115 est un partenaire de la protéine virale Tat. PICH-115 peut lier Tat directement *in vitro* en plus d'enrichir la formation du complexe de trans-activation, formé de l'ARN viral TAR et Tat. Puisque nous avons été capables d'observer l'interaction entre Tat et PICH-115 *in cellulo*, par immunoprécipitation (résultats non-publiés d'Emmanuelle Wilhelm) ainsi que l'interaction *in cellulo* entre PICH-115 et la protéine PICH-130 du complexe de pré-initiation du VIH, nous avons établi le modèle d'interaction protéique au niveau du promoteur du VIH (figure 23). Notre protéine d'intérêt, PICH-115, servirait alors d'un facteur physique qui réunit les composants cellulaires interagissant directement avec l'ADN du promoteur et Tat dans le but d'activer l'expression des gènes viraux. L'interaction PICH-115/Tat mérite d'être explorée davantage pour mieux comprendre le rôle que joue PICH-115 dans la transcription du VIH. Comme par exemple, il serait intéressant d'étudier comment PICH-115 interagit avec le complexe Tat-Cycline T1 puisque les sites de liaison de Tat avec Cycline T1 et PICH-115 se chevauchent et que PICH-115 et Cycline T1 semblent interagir *in cellulo* (expérience réalisée par Emmanuelle Wilhelm).





**Figure 23. Modèle d'interaction protéique au niveau du PICCH et l'axe de trans-activation du VIH.** Sur ce modèle on peut voir que les protéines de PICCH (37, 130 et 115) forment un lien entre la séquence d'ADN du promoteur de base du VIH, TASHET, avec l'axe de trans-activation de la transcription (Tat/TAR). On peut également voir l'association des facteurs de transcription générale en nuage gris (GTF). (Développé par Emmanuelle Wilhelm)

### 3.4 PERSPECTIVES

Les travaux que j'ai présentés dans ce mémoire m'ont permis de vérifier un lien physique entre l'axe de trans-activation du VIH, qui comprend l'ARN TAR et la protéine virale Tat, et le complexe de pré-initiation du VIH (PICCH) qui reconnaît directement l'ADN du promoteur central du VIH (TASHET). Ce lien physique se manifeste sous la forme de la protéine nucléolaire PICCH-115 qui interagit avec Tat autant *in cellulo* qu'*in vitro*. La liaison directe entre ces deux protéines nous a encouragé à poser l'hypothèse que PICCH-115 sera essentiel à la transcription du génome viral intégré dans le génome d'une cellule infectée. Pour pouvoir évaluer l'impact de PICCH-115 sur la transcription virale, il est impératif d'étudier cette protéine dans un contexte plus biologique. Dans nos essais *in vitro*, nous n'ayons pas été capables d'observer une nécessité des activités enzymatiques de PICCH-115 pour la formation du complexe Tat/TAR. Toutefois, il n'est pas exclu que PICCH-115 ait besoin de ses activités d'acétyl transférase et d'ATPase pour produire des

modifications post-traductionnelles chez les protéines, et/ou même les ARNs, qui se retrouvent dans les parages lors de la transcription virale.

Ainsi, nous avons élaboré une expérience de sauvetage phénotypique dans un modèle cellulaire. Cette expérience nous permettra de déterminer si PICH-115 est essentiel à la transcription virale dans le cas d'une infection par un virus pseudotypé avec un gène rapporteur contrôlé par le promoteur du VIH. Nous pouvons également évaluer l'effet qu'auraient des mutations ponctuelles de la protéine PICH-115 qui annuleraient ses activités enzymatiques. Pour ce faire, j'ai développé des lignées cellulaires HeLa, qui expriment des protéines PICH-115 exogènes TS et mutées, par infection avec des lentivirus et sélection par résistance à la blasticidine. Ces cellules seront traitées par un siRNA ciblant le PICH-115 endogène seulement, ainsi qu'un siRNA contre les protéines PICH-115 endogènes et exogènes, à une dose et pendant une période de temps qui assurent leur survie. Par la suite, ces cellules seront infectées par un virus pseudotypé contenant un gène de luciférase qui sera dirigé par le promoteur du VIH. Ce lentivirus peut également exprimer la protéine virale Tat, pour que le scénario d'infection soit le plus proche d'une situation biologique que possible. L'activité de l'enzyme luciférase sera quantifiée par luminométrie. Ceci nous permettra de voir si l'absence de PICH-115, ou la présence d'un PICH-115 dans activité enzymatique, a un effet sur l'expression de la luciférase, et donc sur l'activité du promoteur viral.

Il est important de réaliser cette expérience, non seulement dans les cellules HeLa, mais également dans les cellules qui sont des cibles biologiques du VIH. Dans le cas où PICH-115 serait essentiel à l'activation de la transcription virale, en servant comme un cofacteur à la protéine Tat, il serait possible de l'utiliser comme une cible pharmaceutique dans le but de développer une cure permanente, soit stérilisante ou fonctionnelle. Nous pensons qu'une telle solution serait concevable puisqu'il existe aujourd'hui un inhibiteur de PICH-115 qui est utilisé pour traiter des cas de laminopathie (Larrieu et al., 2014). Ce traitement utilise un inhibiteur nommé

Remodelin de façon dose-dépendante pour voir un effet correcteur de la structure nucléaire dans les cellules, sans causer leur mort.

## REMERCIEMENTS

Les trois années que j'ai passées dans le laboratoire m'ont donné l'occasion de rencontrer plusieurs personnes qui m'ont chaleureusement guidée à travers mes études. J'aimerai tout d'abord remercier mon directeur de recherche P<sup>r</sup> Brendan Bell, pour m'avoir laissé développer mes compétences expérimentales dans son laboratoire avec un projet qui lui tenait à cœur. Ses conseils m'ont beaucoup aidée à développer mon esprit critique en tant que scientifique et à raffiner mes talents de présentatrice. Je voudrai également remercier mon mentor, François Bachand, pour avoir été prêt à m'écouter et me rassurer quand j'en avais besoin. J'aimerai surtout remercier Emmanuelle Wilhelm, la maman du laboratoire, ma superviseuse de stage et ma chère collègue. Merci pour tes conseils, ton temps, tes connaissances et surtout pour ta patience durant ma formation scientifique! Sans toi, je serais bien perdue! En parlant de collègues, je ne peux surtout pas oublier de remercier Aurélie et Chiquita (Édith) qui n'ont jamais hésité à m'aider à exécuter ou compléter une expérience. Elles étaient toujours présentes à chaque pratique de séminaire, avec des commentaires constructifs et des conseils indispensables à mon apprentissage. Je vous remercie sincèrement pour toute votre aide professionnelle, mais encore plus pour votre amitié et gentillesse. Je tiens également à remercier mes deux stagiaires, Loukas et Marie-Ève, qui m'ont beaucoup aidée dans l'avancement de mon projet.

J'aimerai remercier les amis que je me suis fait : Joannie, Sarah, Steve et Erin. Vous avez toujours été là pour m'écouter, me dépanner, me consoler. Merci pour ces trois années de solidarité!

Finalement, je remercie fortement ma famille et mes amis qui m'ont constamment servi de système de soutien et d'encouragement. Vous m'avez tous donné, à votre façon unique, la force et la motivation pour me rendre à la fin de mes études. Je ne pourrais pas être là où je suis sans vous. Merci beaucoup.

## Liste des références

Abrahams JP, Leslie AnGW, Lutter R, John E. Walker (1994) Direct interaction of human TFIID with the HIV-1 transactivator Tat. *Nature* (370):621–628.

Ailenberg M, Silverman M (1996) Description of a one step staggered reannealing method for directional cloning of PCR-generated DNA using sticky-end ligation without employing restriction enzymes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* (39):771–779.

Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D (1994) Nef induces CD4 endocytosis: Requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* (76):853–864.

Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Silverstein RL, Bhardwaj N (1998) Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphabeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* (7):1359-1368.

Ao Z, Jayappa KD, Wang B, Zheng Y, Wang X, Peng J, Yao X (2012) Contribution of host nucleoporin 62 in HIV-1 integrase chromatin association and viral DNA integration. *J. Biol. Chem.* (287):10544–10555.

Archin NM, Sung JM, Garrido C, Soriano-Sarabia N, Margolis DM (2014) Eradicating HIV-1 infection: seeking to clear a persistent pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* (12):750–64.

Armitage AE, Deforche K, Chang C, Wee E, Kramer B, John J, Gerstoft J, Fugger L, Mcmichael A, Rambaut A, et al. (2012) APOBEC3G-Induced Hypermutation of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Is Typically a Discrete “‘ All or Nothing ’” Phenomenon. *PLoS Gen.* (8):22–24.

Arts EJ, Hazuda DJ (2012) HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* (2):a007161.

Barnes DE, Lindahl T. (2004) Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Gen* (38):445-76

Barré-Sinoussi F, Chermann J, Rey F, Nugeyres M, Chamaret S, Gruest J, Daudguet C, Axler-Blin C, Vézinat-Brun F, Rouzioux C, et al. (1983) Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Nature* (20):493–494.

Barré-Sinoussi F, Ross AL, Delfraissy J-F (2013) Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat. Rev. Microbiol.* (11):877–883.

Bassett AR, Liu J-L (2014) CRISPR/Cas9 and genome editing in *Drosophila*. *J. Genet. Genomics* (41):7–19.

Bebenek K, Abbotts J, Roberts JD, Wilson SH, Kunkel TA (1989) Specificity and mechanism of error-prone replication by human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* (264):16948–16956.

Beilhartz GL, Götte M (2010) HIV-1 Ribonuclease H: Structure, Catalytic Mechanism. *Viruses* (1):900–926.

Ben Haij N, Leghmari K, Planès R, Thieblemont N, Bahraoui E (2013) HIV-1 Tat protein binds to TLR4-MD2 and signals to induce TNF- $\alpha$  and IL-10. *Retrovirology* (10):123.

Berkhout B, Jeang K (1992) Functional Roles for the TATA Promoter and Enhancer in Basal and Tat-Induced Expression of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Long Terminal Repeat. *J. Virol.* (66):139–149.

Bergamini A, Dini L, Capozzi M, Ghibelli L, Placido R, Faggioli E, Salanitro A, Buonanno E, Cappannoli L, Ventura L, et al. (1996) Human Immunodeficiency Virus- Induced Cell Death in Cytokine-Treated Macrophages Can Be Prevented by Compounds that Inhibit Late Stages of Viral Replication. *J. Inf. Dis.* (173):1367-78.

Berger EA, Doms RW, Fenyö E-M, Korber BTM, Littman DR, Moore JP, Sattentau QJ, Schuitemaker H, Sodroski J, Weiss RA (1998) A new classification for HIV-1. *Nature* (391):240–240.

Bernecky C, Taatjes DJ (2012) Activator – Mediator Binding Stabilizes RNA Polymerase II Orientation within the Human Mediator – RNA Polymerase II – TFIIF Assembly. *J. Mol. Biol.* (417):387–394.

Beyrer C, Baral Stefan D, van Griensven F, Goodreau Steven M, Chariyalertsak S, Wirtz Andrea L, Brookmeyer R (2012) Global epidemiology of HIV infection in men who have sex with men. *Lancet* (380):367–377.

Beyrer C, Sullivan P, Sanchez J, Baral SD, Collins C, Wirtz AL, Altman D, Trapence G, Mayer K (2013) The increase in global HIV epidemics in MSM. [Internet]. *AIDS* (27):2665–78.

Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, Xavier RJ, Lieberman J, Elledge SJ (2008) Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* (319):921–926.

Briz V (2006) HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *J. Antimicrob. Chemother.* (57):619–627.

Brother MB, Chang H, Lisziewicz J, Su D, Murty LC, Ensoli B (1996) Block of Tat-Mediated Transactivation of Tumor Necrosis Factor  $\beta$  Gene Expression by Polymeric-TAR Decoys. *Virology* (256):252–256.

Čabart P, Újvári A, Pal M, Luse DS (2011) Transcription factor TFIIF is not required for initiation by RNA polymerase II , but it is essential to stabilize transcription factor TFIIB in early elongation complexes. *PNAS* (108):15786–15791.

Campbell-Yesufu OT, Gandhi RT (2011) Update on Human Immunodeficiency Virus ( HIV ) -2 Infection. *Clin. Inf. Dis.* (52):780–787.

Cano F, Bye H, Duncan LM, Buchet-poyau K, Billaud M, Wills MR, Lehner PJ (2012) The RNA-binding E3 ubiquitin ligase MEX-3C links ubiquitination with MHC-I mRNA degradation. *EMBO J.* (31):3596–3606.

Chimnaronk S, Suzuki T, Manita T, Ikeuchi Y, Yao M, Suzuki T, Tanaka I (2009) RNA helicase module in an acetyltransferase that modifies a specific tRNA anticodon. *EMBO J.* (28):1362–1373.

Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, Boucher G, Boulassel M-R, Ghattas G, Brenchley JM, et al. (2009) HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat. Med.* (15):893–900.

Christ F, Debyser Z (2013) The LEDGF/p75 integrase interaction, a novel target for anti-HIV therapy. *Virology* (435):102–109.

Chun TW, Finzi D, Margolick J, Chadwick K, Schwartz D, Siliciano RF (1995) In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat. Med.* (1):1284–1290.

Churcher M, Lamont C, Hamy F, Dingwall S, Lowe A, Butler J, Gait M, Karn J (1993) High affinity binding of TAR RNA by the Human Immunodeficiency Virus Type-1 tat protein requires base-pairs in the RNA stem amino acid residues flanking the basic region. *J. Mol. Biol.* (230):90–110.

Clapham PR, McKnight Á (2001) HIV-1 receptors and cell tropism. *Br. Med. Bull.* (58):43–59.

Clavel F (2004) Mechanisms of HIV Drug Resistance: A Primer. *PRN Noteb.* (9):3-7

Coakley E, Petropoulos CJ, Whitcomb JM (2005) Assessing chemokine co-receptor usage in HIV. *Curr. Opin. Infect. Dis.* (18):9–15.

Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. (1997) The Retroviral Protease *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press Consulté au: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19438/>

Colson P, Ravaux I, Tamalet C, Glazunova O, Baptiste E, Chabriere E, Wiedemann A, Lacabartz C (2014) HIV infection en route to endogenization : two cases. *Virology* (20):1280–1288.



Cooper GM (2000) Eukaryotic RNA polymerases and General Transcription Factors. *The Cell: A Molecular Approach*. Sunderland (MA): Sinauer Associates (2nd edition). Consulté à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9839/>

Dahabieh MS, Battivelli E, Verdin E (2015) Understanding HIV Latency: The Road to an HIV Cure. *Annu. Rev. Med.* (66):407–421.

Darcis G, Kula A, Bouchat S, Fujinaga K, Corazza F, Ait-ammar A, Melard A, Kabeya K, Pianowski F, Gama L, et al. (2015) An In-Depth Comparison of Latency-Reversing Agent Combinations in Various In Vitro and Ex Vivo HIV-1 Latency Models Identified Potently Reactivate Viral Gene Expression. *PLoS Pathog.* doi:10.1371/journal.ppat.1005063. Consulté le 29 mars 2016.

Deeks SG (2012) HIV: Shock and kill. *Nature* (487):439–440.

Deeks SG, Walker BD (2007) Review Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy. *Cell Press Immu.* doi:10.1016/j.immuni.2007.08.010. Consulté le 14 novembre 2015.

Delelis O, Carayon K, Saïb A, Deprez E, Mouscadet J-F (2008) Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology* (5):114.

Desfosses Y, Solis M, Sun Q, Grandvaux N, Lint C Van, Burny A, Gatignol A, Wainberg MA, Lin R, Hiscott J (2005) Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gene Expression by Clade-Specific Tat Proteins. *J. Virol.* (79):9180–9191.

Dey SS, Xue Y, Joachimiak MP, Friedland GD, John C, Zhou Q, Arkin AP, Schaffer D V, et al. (2012) Mutual information analysis reveals coevolving residues in Tat that compensate for two distinct functions in HIV-1 gene expression. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.M111.302653. Consulté le 17 juillet 2015.

Dickinson LA, Gulizia RJ, Trauger JW, Baird EE, Mosier DE, Gottesfeld JM, Dervan PB (1998) Inhibition of RNA polymerase II transcription in human cells by synthetic DNA-binding ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (95):12890–5.

D’Orso I, Frankel AD (2010) RNA-mediated displacement of an inhibitory snRNP complex activates transcription elongation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (17):815–821.

Dvir A, Conaway R, Conaway J W (1997) A role for TFIIH in controlling the activity of early RNA polymerase II elongation complexes. *Natl. Acad. Sci.* (94):9006–9010.

Ebina H, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y (2013) Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. *Sci. Rep.* (3):2510.

Eilebrecht S, Wilhelm E, Benecke B-J, Bell B, Benecke AG (2013) HMGA1 directly interacts with TAR to modulate basal and Tat-dependent HIV transcription. *RNA Biol.* (10):1–9.

Eisele E, Siliciano RF (2012) Redefining the Viral Reservoirs that Prevent HIV-1 Eradication. *Immunity* (37):377–388.

Felber BK, Drysdale CM, Pavlakis GN (1990) Feedback Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Expression by the Rev Protein. *J. Virol.* (64):3734–3741.

Feng JY, Ly JK, Myrick F, Goodman D, White KL, Svarovskaia ES, Borroto-Esoda K, Miller MD (2009) The triple combination of tenofovir, emtricitabine and efavirenz shows synergistic anti-HIV-1 activity in vitro: a mechanism of action study. *Retrovirology* (6):44.

Fineran PC, Charpentier E (2012) Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: acquisition of new information. [Internet]. *Virology* (434):202–9.

Fischer U, Huber J, Boelens wilbert c., Mattaj W, Reinhard L (1995) The HIV-1 Rev Activation Domain Is a Nuclear Export Signal That Accesses an Export Pathway Used by Specific Cellular RNAs. *Cell* (82):475–483.

Fraldi A, Licciardo P, Majello B, Giordano A, Lania L (2001) Distinct Regions of CyclinT1 are Required for Binding to CDK9 and for Recruitment to the HIV-1 Tat / TAR Complex. *J. Cell. Biochem.* (36):247–253.

Fraldi A, Varrone F, Napolitano G, Michels A a, Majello B, Bensaude O, Lania L (2005) Inhibition of Tat activity by the HEXIM1 protein. *Retrovirology* (2):42.

Freed EO: HIV-1 Gag Proteins (1998) Diverse Functions in the Virus Life Cycle. *Virology* (251):1–15.

Gallo RC (2006) A reflection on HIV / AIDS research after 25 years Periods of Aids History. *Retrovirology* (3):72.

Garber ME, Wei P, Kewalramani VN, Mayall TP, Herrmann CH, Rice AP, Littman DR, Jones KA (1998) The interaction between HIV-1 Tat and human cyclin T1 requires zinc and a critical cysteine residue that is not conserved in the murine CycT1 protein. *Genes Dev.* (1):3512–3527.

Garden GA (2002) Microglia in Humand Immunodeficiency Virus-Associated Neurodegeneration. *GLIA* (40):240-251

Gautier VW, Gu L, O'Donoghue N, Pennington S, Sheehy N, Hall WW (2009) In vitro nuclear interactome of the HIV-1 Tat protein. *Retrovirology* (6):47.

Goodier JL, Cheung LE, Jr HHK (2013) Mapping the LINE1 ORF1 protein interactome reveals associated inhibitors of human retrotransposition. *Nucleic Acids Res.* (41):7401–7419.

Groschel B, Bushman F (2005) Cell Cycle Arrest in G 2 / M Promotes Early Steps of Infection by Human Immunodeficiency Virus. *J. Virol.* (79):5695–5704.

Hahn BH, Shaw GM, Taylor ME (1986) Genetic variation in HTLV-III/LAV over time in patients with AIDS or at risk for AIDS. *Science* (232):1548–1553.

Harris RS, Liddament MT, Hall J (2004) Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat. Rev. Immunol.* (4):868–877.

Hetzer C, Bisgrove D, Cohen MS, Pedal A, Kaehlcke K, Speyerer A, Bartscherer K, Taunton J (2007) Recruitment and Activation of RSK2 by HIV-1 Tat. *PLoS One* doi:10.1371/journal.pone.0000151. Consulté le 28 juin 2014.

Hofmann H, Logue EC, Bloch N, Daddacha W, Polsky SB, Schultz ML, Kim B (2012) The Vpx Lentiviral Accessory Protein Targets SAMHD1 for Degradation in the Nucleus. *J. Virol.* (86):12552–12560.

Höck J, Weinmann L, Ender C, Ru S, Kremmer E, Raabe M (2007) Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO* (8):1052–1060.

Hrecka K, Hao C, Gierszewska M, Swanson Selene K., Kesik-Brodacka M, Srivastava S, Florens L, Washburn Michael P, Skowronski J (2011) Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* (474):658–661.

Hughes PJ, Cretton-scott E, Teague A, Wensel TM (2011) Protease Inhibitors for Patients With HIV- 1 Infection A Comparative Overview D RUG C LASS R EVIEW : Protease Inhibitors for HIV-1 Infection. *Pharm. Ther.* (36):332–345.

Imbalzanoss AN, Zaretn KS, Kingstonsii RE (1994) Transcription Factor (TF) IIB and TFIIA Can Independently of the TATA-binding Protein. *J. Biol. Chem.* (269):8280–8286.

Ito S, Akamatsu Y, Noma A, Kimura S, Miyauchi K, Ikeuchi Y, Suzuki T, Suzuki T (2014) A single acetylation of 18 S rRNA is essential for biogenesis of the small ribosomal subunit in *saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* (289):26201–26212.

Janeway CA, Travers Jr P, Walport M, Shlomchik MJ (2001) B-cell activation by armed T-cells. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York: Garland Science (5<sup>e</sup> ed. 2001) Consulté au: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27142/>

Ji X, Zhou Y, Pandit S, Huang J, Li H, Lin CY, Xiao R, Burge CB, Fu X-D (2013) SR proteins collaborate with 7SK and promoter-associated nascent RNA to release paused polymerase. *Cell* (153):855–68.

Jonkers I, Lis JT (2015) Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat. Publ. Gr.* (16):167–177.

Karn J, Stoltzfus CM (2012) Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* (2):a006916.

Kashanchi F, Khleif SN, Duvall JF, Sadaie MR, Radonovich MF, Cho M, Martin MA, Chen S, Weinmann R, Brady JN (1996) Interaction of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat with a Unique Site of TFIID Inhibits Negative Cofactor Dr1 and Stabilizes the TFIID-TFIIA Complex. *J. Virol.* (70):5503–5510.

Kashanchi F, Sadaie MR, Brady JN (1997) Inhibition of HIV-1 transcription and virus replication using soluble Tat peptide analogs. *Virology* (227):431–8.

Kashanchi F, Shibata R, Ross EK, Brady JN, Martin MA (1994) Second-site long terminal repeat (LTR) revertants of replication- defective human immunodeficiency virus: effects of revertant TATA box motifs on virus infectivity, LTR-directed expression, in vitro RNA synthesis, and binding of basal transcription factor. *J Virol* (68):3298–3307.

Kilareski EM, Shah S, Nonnemacher MR, Wigdahl B (2009) Regulation of HIV-1 transcription in cells of the monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology* (6):118.

Kingsmen SM, Kingsmen AJ (1996) The regulation of human immunodeficiency virus type-1 gene expression. *Eur. J. Biochem* (240):491-507

- Kim YK, Bourgeois CF, Isel C, Churcher MJ, Karn J (2002) Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain by CDK9 is directly responsible for human immunodeficiency virus type 1 Tat-activated transcriptional elongation. *Mol. Cell. Biol.* (22):4622–4637.
- Klink TA, Vicentini AM, Hofsteenge J, Raines RT (2001) High-level soluble production and characterization of porcine ribonuclease inhibitor. *Protein Expr. Purif.* (22):174–179.
- Laird GM, Bullen CK, Rosenbloom DIS, Martin AR, Hill AL, Durand CM, Siliciano JD, Siliciano RF (2015) Ex vivo analysis identifies effective HIV-1 latency – reversing drug combinations. *J. Clin. Invest.* (125):1901–1912.
- Lalezari jacob p, Henry K, O’hearn M, Montaner J, Piliero P, Trottier B (2003) Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America. *New Engl. J. Med.* (348):2239–2246.
- Larrieu D, Britton S, Demir M, Rodriguez R, Jackson SP (2014) Chemical inhibition of NAT10 corrects defects of laminopathic cells. *Science* (344):527–32.
- Laurent-Crawford AG, Krust B, Muller S, Riviere Y, Rey-cuillé M-A, Béchet J-M, Montagnier L, Hovanessian ara G. (1991) The Cytopathic Effect of HIV Is Associated with Apoptosis. *Virology* (839):829–839.
- Lecossier, D., Bouchonnet, F., Clavel, F., Hance A (2003) Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science* (300):1112.
- Le Rouzic E, Bonnard D, Chasset S, Bruneau J, Chevreuil F, Strat F Le (20130) Dual inhibition of HIV-1 replication by integrase- LEDGF allosteric inhibitors is predominant at the post-integration stage. *Retrovirology* (10):144.
- Le Tortorec A, Dejucq-Rainsford N (2009) HIV infection of the male genital tract – consequences for sexual transmission and reproduction. *Int. J. Androl.* (33):98–108.
- Li G, Bukrinsky M, Zhao Richard Yuqi (2013) HIV-1 viral protein R (Vpr) and its interactions with the host cell. *Curr. HIV Res.* (7):178–183.

- Lieberman-Blum SS, Fung HB, Bandres JC (2008) Maraviroc: a CCR5-receptor antagonist for the treatment of HIV-1 infection. *Clin. Ther.* (30):1228–50.
- Liu H, Fu Y, Xie J, Cheng J, Ghabrial SA, Li G, Peng Y, Yi X, Jiang D (2011) Widespread Endogenization of Densoviruses and Parvoviruses in Animal and Human Genomes. *J. Virol.* (85):9863–9876.
- Liu X, Tan Y, Zhang C, Zhang Y, Zhang L, Ren P (2016) Nat10 regulates p53 activation through acetylating p53 at K120 and ubiquitinating Mdm2. *EMBO Rep.* doi 10.15252/embr.201540505. Consulté le 16 février 2016.
- Lv J, Liu H, Wang Q, Tang Z, Hou L, Zhang B (2003) Molecular cloning of a novel human gene encoding histone acetyltransferase-like protein involved in transcriptional activation of hTERT. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (311):506–513.
- Majello B, Napolitano G, De Luca P, Lania L (1998) Recruitment of human TBP selectively activates RNA polymerase II TATA-dependent promoters. *J. Biol. Chem.* (273):16509–16.
- Malderelli F, Wu X, Su L, Simonetti F, Shao W, Hill S, Spindler J, Ferris A, Mellors J, Kearny M, et al. (2014) Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science* (345):179–183.
- Marini B, Kertesz-Farkas A, Ali H, Lucic B, Lisek K, Manganaro L, Pongor S, Luzzati R, Recchia A, Mavilio F, et al. (2015) Nuclear architecture dictates HIV-1 integration site selection. *Nature* (521):227–233.
- Maston GA, Evans SK, Green MR (2006) Transcriptional Regulatory Elements in the Human Genome. *Annu. Rev. genomics Hum. Genet.* (7):29–59.
- McCune JM, Rabin LB, Feinberg MB, Lieberman M, Kosek JC, Weissman L (1988) Endoproteolytic Cleavage of gp160 Is Required for the Activation of Human Immunodeficiency Virus. *Cell* (53):55–67.

Menéndez-Arias L (2008) Mechanisms of resistance to nucleoside analogue inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Virus Res.* (134):124–146.

Meyerhans A, Cheynier R, Albert J, Seth M, Kwok S, Sninsky J, Morfeldt-Manson L, Asjo B, Wain-Hobson S (1989) Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell* (58):901–910.

Mi S, Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, Lavallie E, Tang X, Edouard P, Howes S, et al. (1999) Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* (403):785–789.

Molina JM, Cahn P, Grinsztejn B, Lazzarin A, Mills A, Saag M, Supparatpinyo K, Walmsley S, Crauwels H, Rimsky LT, et al. (2011) Rilpivirine versus efavirenz with tenofovir and emtricitabine in treatment-naive adults infected with HIV-1 (ECHO): A phase 3 randomised double-blind active-controlled trial. *Lancet* (378):238–246.

Moore MD, Hu W-S (2009) HIV-1 RNA Dimerization: It Takes Two to Tango. *AIDS Rev.* (11):91–102.

Mousseau G, Kessing CF, Fromentin R, Trautmann L, Chomont N, Valente T (2015) The Tat Inhibitor Didehydro-Cortistatin A Prevents HIV-1 Reactivation from Latency. *J. Microbiol.* (6):1–14.

Muniz L, Egloff S, Ughy B, Jády BE, Kiss T (2010) Controlling cellular P-TEFb activity by the HIV-1 transcriptional transactivator Tat. *PLoS Pathog.* (6):e1001152.

Naji S, Cimerman P, Reyes JR, Johnson JR, Filbrandt R, Huber MD, Vesely P, Krogan NJ, Iiit JRY, Saphire AC, et al. (2012) Host Cell Interactome of HIV-1 Rev Includes RNA Helicases Involved in Multiple Facets of Virus Production. *Mol. Cell. proteomics* (11):1–14.

Nyamweya S, Hegedus A, Jaye A, Rowland-jones S, Flanagan KL, Macallan DC (2013) Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. *Rev. Med. Virol.* (23):221–240.



Okoye AA, Picker LJ (2013) CD4+ T-Cell Depletion In Hiv Infection: Mechanisms Of Immunological Failure. *Immunol. Rev.* (254):54–64.

Okumura Y, Yano M, Murakami M, Mori S, Towatari T, Kido H (1998) The extracellular processing of HIV-1 envelope glycoprotein gp160 by human plasmin. *J Virol* (442):39–42.

Olsen HS, Rosen CA (1992) Contribution of the TATA motif to Tat-mediated transcriptional activation of human immunodeficiency virus gene expression. *J Virol* (66):5594–5597.

Orsini MJ, Debouck CM, Webb CL, Lysko PG, Beecham S (1996) Extracellular Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Protein Promotes Aggregation and Adhesion of Cerebellar Neurons. *Neuroscience* (76):2546–2552.

Perelson A, Newmann A, Markowitz M, Leonard J, Ho D (1996) HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* (271):1582–1586.

Perelson A, Essunger P, Cao Y, Vesanen M, Hurley A, Saksela K, Markowitz M, Ho D (1997) Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* (387):188–191.

Perkins ND, Edwards NL, Duckett CS, Agranoff a B, Schmid RM, Nabel GJ (1993) A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *EMBO* (12):3551–3558.

Plaschenka C, Lariviere L, Wenzek L, Seizl M, Hemann M, Tegunov D, Petrotchenko E V, Borchers CH (2015) Architecture of the RNA polymerase II – Mediator core initiation complex. *Nature* (518):376–396.

Poeschla EM (2008) Integrase, LEDGF/p75 and HIV Replication. *Cell Mol Life Sci* (141):520–529.

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar a F, Bunn P a, Minna JD, Gallo RC (1980) Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured

lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (77):7415–7419.

Pollard VW, Malim MH (1998) The HIV-1 Rev protein. *Annu. Rev. Microbiol.* (52):491–532.

Poss ZC, Ebmeier CC, Taatjes DJ (2013) The Mediator complex and transcription regulation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* (48):575–608.

Ran FA, Hsu PD, Lin C-Y, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, et al. (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* (154):1380–9.

Ronsard L, Lata S, Singh J, Ramachandran VG, Das S, Banerjee AC (2014) Molecular and genetic characterization of natural HIV-1 Tat exon-1 variants from North India and their functional implications. *PLoS One* (9):2334.

Roy S, Delling U, Rosen CA (1990) A bulge structure in HIV-I TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated trans-activation. *Genes Dev.* (4):1365–1373.

Ruelas DS, Greene WC (2013) An integrated overview of HIV-1 latency. *Cell* (155):519–29.

Ryoo J, Choi J, Oh C, Kim S, Seo M, Kim S, Seo D, Kim J, White TE, Brandariz-núñez A, et al. (2014) The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction. *Nat. Med.* (20):936–941.

Sainsbury S, Niesser J, Cramer P (2013) Structure and function of the initially transcribing RNA polymerase II–TFIIB complex. *Nature* (493):437–441.

Saksena NK, Wang B, Zhou L, Soedjono M, Ho Ung S, Conceicao V (2010) HIV reservoirs in vivo and new strategies for possible eradication of HIV from the reservoir sites. *HIV/AIDS - Res. Palliat. care* (2):103–122.

Schröder a. RW, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F (2002) HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* (110):521–529.

Shan L, Yang H-C, Rabi SA, Bravo HC, Shroff NS, Irizarry R a, Zhang H, Margolick JB, Siliciano JD, Siliciano RF (2011) Influence of host gene transcription level and orientation on HIV-1 latency in a primary-cell model. *J. Virol.* (85):5384–5393.

Sharma S, Langhendries J-L, Watzinger P, Kötter P, Entian K-D, Lafontaine DLJ (2015) Yeast Kre33 and human NAT10 are conserved 18S rRNA cytosine acetyltransferases that modify tRNAs assisted by the adaptor Tan1/THUMP1. *Nucleic Acids Res.* (43):2242–58.

Shen Q, Zheng X, McNutt M a., Guang L, Sun Y, Wang J, Gong Y, Hou L, Zhang B (2009) NAT10, a nucleolar protein, localizes to the midbody and regulates cytokinesis and acetylation of microtubules. *Exp. Cell Res.* (315):1653–1667.

Siliciano RF, Greene WC (2011) HIV latency. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* (1):1–19.

Sims III, Robert J; Belotserkovskaya R, Reinberg D (2004) Elongation by RNA polymerase II : the short and long of it. *Genes Dev.* (18):2437–2468.

Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, Mujica AO, Thomas M, Harrow J, Cox T, et al. (2011) A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* (474):337–42.

Spitz F, Furlong EEM (2012) Transcription factors : from enhancer binding to developmental control *Nat. Publ. Gr.* (13):613–626.

Stopak K, Noronha C De, Yonemoto W, Greene WC, Francisco S (2003) HIV-1 Vif Blocks the Antiviral Activity of APOBEC3G by Impairing Both Its Translation and Intracellular Stability. *Mol. Cell* (12):591–601.

Sundquist WI, Krausslich HG (2012) HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med* (2):a006924.

Sune C, Garcia-Blanco MA (1995) Transcriptional trans activation by human immunodeficiency virus type 1 Tat requires specific coactivators that are not basal factors. *J Virol* (69):3098–3107.

Sune C, Garcia-Blanco MA (1999) Transcriptional Cofactor CA150 Regulates RNA Polymerase II Elongation in a TATA-Box-Dependent Manner. *Mol. Cell. Biol.* (19):4719–4728.

Suzuki T, Ito S, Horikawa S, Suzuki T, Kawauchi H, Tanaka Y, Suzuki T (2014) Human NAT10 is an ATP-dependent rna acetyltransferase responsible for N4-acetylcytidine formation in 18 S ribosomal RNA (rRNA). *J. Biol. Chem.* (289):35724–35730.

Tahirov TH, Babayeva ND, Varzavand K, Cooper JJ, Sedore SC, Price DH (2010) Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb. *Nature* (465):747–51.

Tamalet C, Colson P (2006) Choix d'une combinaison fixe d'inhibiteurs nucléos(t)idiques en vue du traitement initial d'une infection à VIH: Apport des données virologiques. *Virologie* (10):333–340.

Tan TZ, Miow QH, Huang RYJ, Wong MK, Ye J, Lau JA, Wu MC, Bin Abdul Hadi LH, Soong R, Choolani M, et al. (2013) Functional genomics identifies five distinct molecular subtypes with clinical relevance and pathways for growth control in epithelial ovarian cancer. *EMBO Mol. Med.* (5):983–998.

Temesgen Z, Siraj DS (2008) Raltegravir: first in class HIV integrase inhibitor. *Ther. Clin. Risk Manag.* (4):493–500.

van der Kuyl AC, Berkhout B (2012) The biased nucleotide composition of the HIV genome : a constant factor in a highly variable virus. *Retrovirology* (9):1.

Van Lint C, Bouchat S, Marcello A (2013) HIV-1 transcription and latency: an update. *Retrovirology* (10):67.

Vodicka MA, Koepp DM, Silver PA, Emerman M (1998) HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Dev.* (2):175–185.

Wang GP, Ciuffi A, Leipzig J, Berry CC, Bushman FD (2007) HIV integration site selection: analysis by massively parallel pyrosequencing reveals association with epigenetic modifications. *Genome Res.* (17):1186–94.

Wei DG, Chiang V, Fyne E, Balakrishnan M, Barnes T, Graupe M, Hesselgesser J, Irrinki A, Murry JP, Stepan G, et al. (2014) Histone Deacetylase Inhibitor Romidepsin Induces HIV Expression in CD4 T Cells from Patients on Suppressive Antiretroviral Therapy at Concentrations Achieved by Clinical Dosing. *PLoS Pathog.* (17):1186-94.

Wilhelm E, Doyle M, Nzaramba I, Magdzinski A, Dumais N, Bell B (2012) CTGC motifs within the HIV core promoter specify Tat-responsive pre-initiation complexes. *Retrovirology* (62):62.

Wilhelm E, Bell B (2013) Selective recognition of viral promoters by host cell transcription complexes: challenges and opportunities to control latency. *Curr. Opin. Virol.* (3):380–6.

Wilhelm E, Takacs C, Bell B (2013) Probing endogenous RNA polymerase II pre-initiation complexes by electrophoretic mobility shift assay. *Methods Mol. Biol.* (809).

Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, Strebel K (1992) Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpu Protein Induces Rapid Degradation of CD4. *J. Virol.* (66):7193–7200.

Wong K, Sharma A, Awasthi S, Matlock EF, Rogers L, Van Lint C, Skiest DJ, Burns DK, Harrod R (2005) HIV-1 Tat interactions with p300 and PCAF

transcriptional coactivators inhibit histone acetylation and neurotrophin signaling through CREB. *J. Biol. Chem.* (280):9390–9.

Woodward CL, Prakobwanakit S, Mosessian S, Chow SA (2009) Integrase interacts with nucleoporin NUP153 to mediate the nuclear import of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* (83):6522–6533.

Xing S, Siliciano RF (2014) Targeting HIV Latency: pharmacologic strategies toward eradication. *Drug Discov. Today* (18):541–551.

Zapp ML, Hope TJ, Parslow TG, Green MR (1991) Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein : A dual function for an arginine-rich binding motif. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (88):7734–7738.

Zauli G, Gibellini D, Caputo A, Bassini A, Negrini M, Monne M, Mazzoni M, Capitani S (1995) The Human Immunodeficiency Virus Type-1 Tat Protein Upregulates Bcl-2 Gene Expression in Jurkat T-cell Lines and Primary Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Blood* (86):3823–3834.

Zhang Y, Reinberg D (2001) Transcription regulation by histone methylation : interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* (15):2343–2360.

Zhu T, Muthui D, Holte S, Nickle D, Feng F, Brodie S, Hwangbo Y, Mullins JI, Corey L (2002) Evidence for human immunodeficiency virus type 1 replication in vivo in CD14(+) monocytes and its potential role as a source of virus in patients on highly active antiretroviral therapy. *J. Virol.* (76):707–16.

ICAD (2001) HIV/AIDS, injection drug use, harm reduction and development.

WHO (2015) Global Health Observatory (GHO) Data: HIV/AIDS. <http://www.who.int/gho/hiv/en/> Consulté le 17 septembre, 2015.

UNAIDS (1998) HIV-related opportunistic diseases: Technical update at a Glance.

UNAIDS (2015) HIV treatment: Parliamentary action and policy options.

UNAIDS (2015) How HIV changed everything.